

Aus der Medizinischen Klinik m. S.  
Kardiologie, Pulmologie und Angiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

# **Suppression der Hypertrophie kardialer Myozyten durch Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Henryk Dreger  
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. Joachim Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Karl Stangl

2. Prof. Dr. Jutta Schaper

3. Prof. Dr. Burkhardt Dahlmann

Eingereicht: 15. November 2002

Datum der Promotion: 20. Juni 2003

### Zusammenfassung

Hypertrophie bezeichnet eine zelluläre Anpassungsleistung, die durch vermehrte Arbeitsbelastung ausgelöst wird und durch Zunahme von Zellgröße und Proteinsynthese sowie durch Veränderungen der Genexpression bei konstanter Zellzahl gekennzeichnet ist. Beim Ubiquitin-Proteasom-System handelt es sich um den wichtigsten intrazellulären Proteinabbaumechanismus eukaryontischer Zellen. Darüber hinaus spielt es eine wichtige Rolle im regulierten Abbau zellulärer Signalmediatoren und Transkriptionsfaktoren.

In einem Hypertrophiemodell mit neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde die Wirkung von Proteasominhibitoren auf die Ausbildung einer Hypertrophie untersucht. Behandlung mit Proteasominhibitoren (MG132, MG262) führte dabei zu einer dosisabhängigen Reduktion des Effekts der eingesetzten hypertrophieinduzierenden Agonisten (Isoproterenol, Angiotensin II, Phenylephrin). So konnte mit Hilfe morphometrischer Analysen Phalloidin-gefärbter Kardiomyozyten eine Verringerung des Zellwachstums gezeigt werden. Western Blots belegten eine verringerte Expression von Hypertrophiemarkerproteinen ( $\beta$ -myosin heavy chain,  $\alpha$ -sarcomeric actin,  $\alpha$ -smooth muscle actin). Analog zu diesen Befunden konnte in einem Reporterassay die Abnahme der Expression des brain natriuretic peptide (BNP) gezeigt werden. Eine reduzierte RNA- und Proteinsynthese konnte mit Hilfe der Inkorporation radioaktiver Substrate nachgewiesen werden.

Als Nachweis für die effiziente Inhibition des Proteasoms durch MG132 dienten Western Blots akkumulierter, polyubiquitinerter Proteine, die reduzierte proteasomale Degradation fluorogener Substrate sowie die Akkumulation eines grün fluoreszierenden Proteins nach Transfektion mit einem Ubiquitin-GFP-Konstrukt.

Als mögliche Mechanismen des antihypertrophen Effekts der Proteasominhibitoren konnten eine verringerte Aktivierbarkeit der MAP Kinasen ERK 1/2 (Western Blots) sowie eine reduzierte Aktivität des Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B (Reporterassay) identifiziert werden.

**Abstract**

Myocardial hypertrophy is an important adaptive response of the heart to increased workload. It is characterized by an increase in cell size and protein synthesis, and alterations in gene expression. The ubiquitin-proteasome-system is the major pathway for intracellular protein degradation in eucaryotic cells. It plays a major role in the regulated degradation of central signal mediators and transcription factors.

In a model system of neonatal rat cardiomyocytes we investigated the effects of proteasome inhibitors on myocardial hypertrophy. Treatment with specific proteasome inhibitors reduced the hypertrophic effects of all used agonists (e.g. isoproterenol, phenylephrin) dose-dependently: 0.05 – 1  $\mu$ M MG132 resulted in a marked reduction of cell size as determined by morphometric analysis of phalloidin-stained myocytes. Moreover, western blot analysis showed a concentration-dependently reduced expression of hypertrophic marker proteins ( $\beta$ -myosin heavy chain,  $\alpha$ -sarcomeric actin,  $\alpha$ -smooth muscle actin). This correlated well with a suppressed expression of brain natriuretic peptide in reportergene assays. Reduced RNA and protein synthesis was determined by incorporation of radioactively labeled substrates.

Efficient inhibition of the proteasome by MG132 was confirmed by increased accumulation of multi-ubiquitinated proteins in western blot analysis, by reduced degradation of fluorogenic substrates and by accumulation of a ubiquitin-conjugated variant of the green fluorescent protein.

Suppression of cardiomyocyte hypertrophy by proteasome inhibition corresponded to reduced ERK 1/2 activation (determined by phospho-specific antibodies) and decreased NF $\kappa$ B activation (determined by luciferase assays).

**Schlagworte**

Hypertrophie, Proteasom, neonatale Rattenkardiomyozyten, Proteasominhibitoren

**Keywords**

hypertrophy, proteasome, neonatal rat cardiomyocytes, proteasome inhibitors

	<b>Inhalt</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Hypertrophie	1
1.1.1 Makroskopische Charakteristika kardialer Hypertrophie	1
1.1.2 Zelluläre Charakteristika kardialer Hypertrophie	2
1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System	8
1.2.1 Markierung der Proteasomsubstrate mit Ubiquitin	9
1.2.2 Struktur des Proteasoms	10
1.2.3 Aufgaben des Proteasoms	12
1.2.4 Selektive Proteasominhibitoren	13
1.3 Zielsetzung der Arbeit	16
<b>2 Materialien und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1 Zellkultur und -präparation	17
2.1.1 Materialien	17
2.1.2 Zellkultur	18
2.1.3 Zellpräparation	18
2.2 Zellstimulation	20
2.2.1 Materialien	20
2.2.2 Durchführung	20
2.3 Zellyse und Proteinextraktion	21
2.3.1 Materialien	21
2.3.2 Durchführung	21
2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration	23
2.4.1 Materialien	23
	VI

	<b>Inhalt</b>
2.4.2 Durchführung	23
2.5 Western Blots	23
2.5.1 Materialien	23
2.5.2 Durchführung	26
2.6 Morphometrie	29
2.6.1 Materialien	29
2.6.2 Durchführung	30
2.7 Transiente Transfektionen mit Reportergenkonstrukten	31
2.7.1 Materialien	31
2.7.2 Durchführung	32
2.8 Luciferase-Assays	36
2.8.1 Materialien	36
2.8.2 Durchführung	36
2.9 Messung der Aktivität des Proteasoms mit Hilfe fluorogener Substrate	37
2.9.1 Materialien	37
2.9.2 Durchführung	38
2.10 Synthesemessungen mittels Substratinkorporation	38
2.10.1 Materialien	38
2.10.2 Durchführung	39
2.11 Statistische Auswertung	40
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1 Untersuchung der Kennzeichen der Hypertrophie	42
3.1.1 Morphometrische Auswertung der Zellfläche	42
	VII

	<b>Inhalt</b>
3.1.2 Nachweis von Hypertrophiemarkerproteinen	47
3.1.3 BNP-Expressionsanalyse	50
3.1.4 Messung der Proteinsynthese	51
3.1.5 Messung der RNA-Synthese	53
3.1.6 Messung der rRNA-Synthese	56
3.2 Nachweis und Quantifizierung der Inhibition des Proteasoms	57
3.2.1 Akkumulation polyubiquitiner Proteine	57
3.2.2 Bestimmung der Aktivität des Proteasoms mittels fluorogener Substrate	59
3.2.3 Transiente Transfektionen mit Ub <sup>G76V</sup> -GFP	60
3.3 Mögliche Mechanismen der Hypertrophiesuppression	61
3.3.1 Signaltransduktion via ERK 1/2	61
3.3.2 Untersuchung der Aktivität von nuclear factor kappa B	66
3.3.3 Untersuchung der Aktivität des activating protein 1	67
<b>4 Diskussion</b>	<b>70</b>
4.1 Kennzeichen der Hypertrophie kardialer Myozyten	71
4.1.1 Reduktion des hypertrophen Zellwachstums	71
4.1.2 Abnahme des Gehalts an Hypertrophiemarkerproteinen	72
4.1.3 Reduzierte BNP-Expression	73
4.1.4 Abnahme der Proteinsynthese	73
4.1.5 Abnahme der RNA-Synthese	74
4.1.6 Abnahme der ribosomalen RNA-Synthese	75
4.2 Nachweis und Quantifizierung der Inhibition des Proteasoms	76
4.2.1 Akkumulation polyubiquitiner Proteine	76
	VIII



	<b>Inhalt</b>
4.2.2 Abnahme der Aktivität des Proteasoms	77
4.2.3 Transfektion mit Ub <sup>G76V</sup> -GFP	77
4.3 Mögliche Mechanismen des antihypertrophen Effekts der Proteasominhibitoren	78
4.3.1 Abnahme der Aktivierbarkeit der MAPK ERK 1/2	78
4.3.2 Abnahme der Aktivität von nuclear factor kappa B	80
4.3.3 Zunahme der Aktivität des activating protein 1	81
4.3.4 Abschließende Bemerkungen	83
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>84</b>
<b>6 Anhang</b>	<b>85</b>
A Abbildungsverzeichnis	85
B Tabellenverzeichnis	89
C Abkürzungsverzeichnis	90
D Literaturverzeichnis	94
E Danksagung	108
F Lebenslauf	109
G Eidesstattliche Erklärung	110

## **1 Einleitung**

### **1.1 Hypertrophie**

Der Begriff Hypertrophie bezeichnet eine zelluläre Anpassungsleistung, die durch Volumenzunahme der Zellen und Vermehrung der funktionellen Substanz bei konstanter Zellzahl gekennzeichnet ist und durch eine subletale Zellschädigung verursacht wird. Unterschieden werden zum einen die kompensatorische Hypertrophie, die durch eine vermehrte Arbeitsbelastung eines Organs ausgelöst wird (z. B. Myokardhypertrophie bei Aortenklappenstenose), und zum anderen die endokrine Hypertrophie, deren Ursache in einem erhöhten Hormonspiegel zu finden ist (z. B. Uterus in der Schwangerschaft). Der zugrunde liegende pathogenetische Mechanismus ist bei allen Hypertrophiearten gleich: auf einen funktionssteigernden Stimulus hin kommt es unter Vermittlung von Transkriptionsfaktoren und durch eine verstärkte Expression von Protoonkogenen zur Initiation einer anabolen Stoffwechsellage, welche mit verstärkter DNA-, RNA- und Proteinsynthese einhergeht. Darüber hinaus werden im Rahmen antikataboler Prozesse der Energieverbrauch, der autophagische Zellumbau und die intrazelluläre Proteolyse reduziert (Riede und Schaefer 1999).

#### **1.1.1 Makroskopische Charakteristika kardialer Hypertrophie**

Das Herz eines Gesunden wiegt zwischen 250-300 g (Frauen) bzw. 300-350 g (Männer). Ab einer Gewichtszunahme von 50 g spricht man von einer Hypertrophie. Die Hypertrophie des Herzens stellt als Adaptation an erhöhte Leistungsanforderungen ein sinnvolles physiologisches System dar. Dabei sind der Zunahme der funktionellen Substanz jedoch – insbesondere beim Herzen – Grenzen gesetzt, nach deren Überschreiten Hypertrophie Krankheitswert gewinnt.

Die wichtigsten Ursachen für die Ausbildung einer Hypertrophie des Herzens sind eine vermehrte Druck- oder Volumenbelastung. Während erstere zumeist die Folge von Stenosen der Herzklappen oder eines erhöhten Blutdrucks ist, entsteht letztere vor allem durch insuffiziente Klappen und Shuntvitien. Beide Formen gehen mit charakteristischen morphologischen Veränderungen sowohl auf

makroskopischer wie auf subzellulärer Ebene einher.

Beiden Fällen gemein ist eine durch die Überlastung ausgelöste Steigerung der Herzleistung durch eine vorübergehende Überfunktion der Myozyten. Diese Überfunktion bewirkt als chronische subletale Zellschädigung eine Zunahme der funktionellen Substanz mit konsekutiver, dauerhafter Leistungssteigerung des Herzens. Bei einer Druckbelastung führt die gesteigerte systolische Wandspannung zur Neubildung von Myofibrillen in paralleler Anordnung, was makroskopisch als Zunahme der Ventrikelwanddicke bei gleichbleibendem Innenvolumen imponiert; man spricht von einer konzentrischen Hypertrophie. Im Falle einer Volumenbelastung hingegen kommt es zur Steigerung der initialen diastolischen Wandspannung, was in einer Verlängerung des kontraktiven Apparats durch die Synthese neuer Sarkomere resultiert. Makroskopisch nehmen Ventrikelwanddicke und Ventrikelvolumen proportional zu; man spricht von einer exzentrischen Hypertrophie.

Der Anpassungsfähigkeit des Herzens sind jedoch Grenzen gesetzt. Kann eine persistierende Belastung nicht kompensiert werden und überschreitet das Herzgewicht die kritische Masse von 500 g, ist das Kapillarsystem nicht mehr in der Lage, das Myokard ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen – es kommt zu Leistungsabfall und Herzinsuffizienz.

### 1.1.2 Zelluläre Charakteristika kardialer Hypertrophie

Bei Kardiomyozyten handelt es sich um terminal ausdifferenzierte, irreversibel postmitotische Zellen. Daher scheidet Zellteilung, sprich: Hyperplasie, als Reaktion auf vermehrte Arbeitsbelastung aus; es kommt zur Hypertrophie. Diese ist gekennzeichnet durch eine Reihe charakteristischer Veränderungen. Hauptmerkmale sind dabei die Volumenzunahme um Faktor 2 bis 3 (Messerli et al. 1993) und der Anstieg des Proteingehalts. Jedoch kommt es nicht zu einem simplen „Mehr an allem“; vielmehr findet sich ein spezifisches Genexpressionsmuster mit konsekutiven Veränderungen des Phänotyps (Swynghedauw et al. 1990, van Bilsen und Chien 1993, Calderone et al. 1995). Dabei kommt es zunächst innerhalb von 30

Minuten zur verstärkten Expression der Transkriptionsfaktoren *egr-1*, *hsp70*, *c-fos*, *c-jun* und *c-myc*. Die Aktivierung dieser so genannten „early response genes“ scheint dabei einer allgemeinen, unspezifischen Antwort ausdifferenzierter Zellen, die die Fähigkeit zur DNA-Replikation verloren haben, auf Wachstum induzierende Reize zu entsprechen (Izumo et al. 1988, Komuro, Kurabayashi et al. 1988, van Bilsen und Chien 1993). Eine spezifischere Reaktion auf hypertrophe Stimuli folgt innerhalb von 6 bis 12 Stunden in Form einer Reexpression fetaler Gene. Das so genannte „fetale Genmuster“ ist charakterisiert durch Expression des atrialen natriuretischen Faktors (ANF) sowie der Strukturproteine  $\beta$ -myosin heavy chain und  $\alpha$ -skeletal actin (Calderone et al. 1995). Analog zum ANF kommt es ebenfalls zu einer Steigerung der Expression des mit ihm nahe verwandten BNP (B-type oder brain natriuretic peptide) (Hanford et al. 1994). Als weitere Reaktion auf eine Hypertrophie induzierende Stimulation kommt es nach 12 bis 24 Stunden zur verstärkten Expression von Proteinen des kontraktilen Apparats wie ventricular myosin light chain 2 (Lee 1988) und  $\alpha$ -cardiac actin (Long 1989).

Die bereits erwähnte Zunahme des Proteingehalts der Zellen wird vor allem durch einen Anstieg der allgemeinen Proteinsyntheserate verursacht (Sugden und Fuller 1991), während die Degradation der Proteine weitgehend unverändert bleibt (McDermott und Morgan 1989). Notwendig dafür ist eine Zunahme des Gehalts an Ribosomen, da bereits im nichthypertrophierten Zustand 90% der Ribosomen ausgelastet sind (Morgan et al. 1992, Hannan und Rothblum 1995).

### *1.1.2.1 Induktoren der kardialen Hypertrophie*

In den letzten Jahren konnte eine Vielzahl von physiologischen und synthetischen Botenstoffen als Auslöser einer Hypertrophie kardialer Myozyten identifiziert werden. Bereits 1982 konnten Simpson und Savion, Pioniere auf dem Gebiet der Kultivierung kardialer Myozyten, zeigen, dass durch Behandlung mit Serum und/ oder Katecholaminen (Isoproterenol, Noradrenalin) Hypertrophie in der Zellkultur induzierbar ist (Simpson und Savion 1982). Als wichtigste hypertroph-wirkende Botenstoffe werden heute Endothelin-1, ein von Arterienendothelzellen gebildeter Vaso-

konstriktor, und  $\alpha_1$ -adrenerge Agonisten wie zum Beispiel Phenylephrin betrachtet (Sugden und Bogoyevitch 1996, Fedida et al. 1993, Terzic et al. 1993, van Bilsen 1997). Als Kandidat wird Angiotensin II diskutiert. Dieses physiologische Peptidhormon des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems wirkt zwar eindeutig Hypertrophie-auslösend, jedoch möglicherweise nicht direkt sondern durch die Freisetzung parakriner Faktoren (Ito, Hirata et al. 1993, Kim et al. 1995). Weitere Induktoren kardialer Hypertrophie finden sich unter den Wachstumsfaktoren (z. B. Fibroblast growth factor [Parker et al. 1990], Insulin-like growth factor [Ito, Hiroe et al. 1993, Levandero et al. 1998]) und in der Gruppe der Zytokine (z. B. Interleukin-1 $\beta$  [Palmer et al. 1995], Cardiotrophin-1 [Wollert et al. 1996]). Als letztes sind noch das Schilddrüsenhormon Trijodthyronin (Schaub et al. 1997) und das Prostaglandin PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (Adams et al. 1996) zu nennen.

Obwohl alle genannten Botenstoffe die Kriterien für Hypertrophie induzierende Wirkstoffe, d. h. Zunahme der Zellgröße, der Myofibrillensynthese und Ausbildung eines typischen Genexpressionsmusters, erfüllen, können sie sich jedoch ansonsten sowohl in der intrazellulären Signaltransduktion wie auch im ausgelösten Genmuster unterscheiden. So induzieren z. B.  $\alpha_1$ -adrenerge Sympathomimetika und Endothelin-1 ein Expressionsmuster, das eher dem einer Hypertrophie aufgrund einer Druckbelastung ähnelt, während das von Cardiotrophin-1 ausgelöste Muster eher dem einer Volumenhypertrophie in vivo entspricht (Sugden und Clerk 1998).

Als weitere Mechanismen, mit denen Hypertrophie ausgelöst werden kann, konnten Dehnung (Komuro, Katoh et al. 1991), Hypoxie (Ito, Adachi et al. 1996) und Zell-Zell-Kontakt (Clark et al. 1998) identifiziert werden. Bei diesen Formen der Hypertrophieinduktion spielt vermutlich die para- und/ oder autokrine Sekretion von Endothelin-1 (Ito, Adachi et al. 1996, Yamazaki et al. 1996) und Angiotensin II (Sadoshima et al. 1993) eine entscheidende Rolle.

### *1.1.2.2 Intrazelluläre Signaltransduktion*

Analog zur Vielzahl an Botenstoffen, die die Fähigkeit besitzen, Hypertrophie aus-

zulösen, gibt es eine große Anzahl parallel wirkender, intrazellulärer Signalübertragungswege (Abbildung 1). Jede Gruppe von Hypertrophie-mediatoren hat dabei präferierte Signalwege. Dies trägt zur Ausprägung unterschiedlicher Phänotypen in Abhängigkeit vom hypertrophen Stimulus bei. Gleichzeitig bestehen jedoch auf verschiedenen Ebenen Querverbindungen zwischen den einzelnen Signalwegen. Eine Ausnahmestellung besitzt dabei das Schilddrüsenhormon  $T_3$ , das durch einen energieverbrauchenden Transportmechanismus von der Zelle aufgenommen (Hefti et al. 1997) und anschließend von  $T_3$ -bindenden Proteinen in den Zellkern transloziert wird, wo es über den nukleären  $T_3$ -Rezeptor auf die Transkription wirkt (Ichikawa und Hashizume 1995). Am Anfang der übrigen Signalketten hingegen stehen zellmembranständige Rezeptoren, die nach Bindung des jeweiligen Botenstoffs eine oder mehrere Signaltransduktionskaskaden in Gang setzen. Unterschieden werden 3 Hauptgruppen von Rezeptoren: 1. die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), zu denen die Rezeptoren der Katecholamine und vasoaktiven Peptide (ET-1, AT II) gehören, 2. die Wachstumsfaktor-Rezeptoren mit Tyrosin- bzw. Threonin/ Serin-Kinase-Aktivität (RTK/ RSTK) und 3. die Zytokin-Rezeptoren (CR).

Bei GPCR handelt es sich um heptahelikale Transmembranrezeptoren, die mit den GTP bindenden, heterotrimeren G-Proteinen interagieren (Neer et al. 1995). Nach Ligandenbindung spaltet sich von diesen die  $\alpha$ -Untereinheit ab und tauscht ein GDP- gegen ein GTP-Molekül aus. Das Dimer aus verbliebener  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit ist nun in der Lage, die Phospholipase  $C\beta$  zu aktivieren. Dieses membranständige Enzym katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat ( $IP_3$ ). DAG aktiviert im folgenden die Proteinkinase C (Jaken 1996), während  $IP_3$  vor allem die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Freisetzung zu steigern vermag (Sugden und Bogoyevitch 1996). Die Wirkung der  $\alpha$ -Untereinheiten ist abhängig von ihrer Zugehörigkeit zu einer der G-Protein-Subfamilien: sie können die Phospholipase  $C\beta$  aktivieren ( $G_q$ ) und die Adenylatzyklase stimulieren ( $G_s$ ) oder hemmen ( $G_i$ ). Das von der Adenylatzyklase gebildete zyklische Adenosinmonophosphat wiederum aktiviert unter anderem die Proteinkinase A (Hefti et al. 1997).

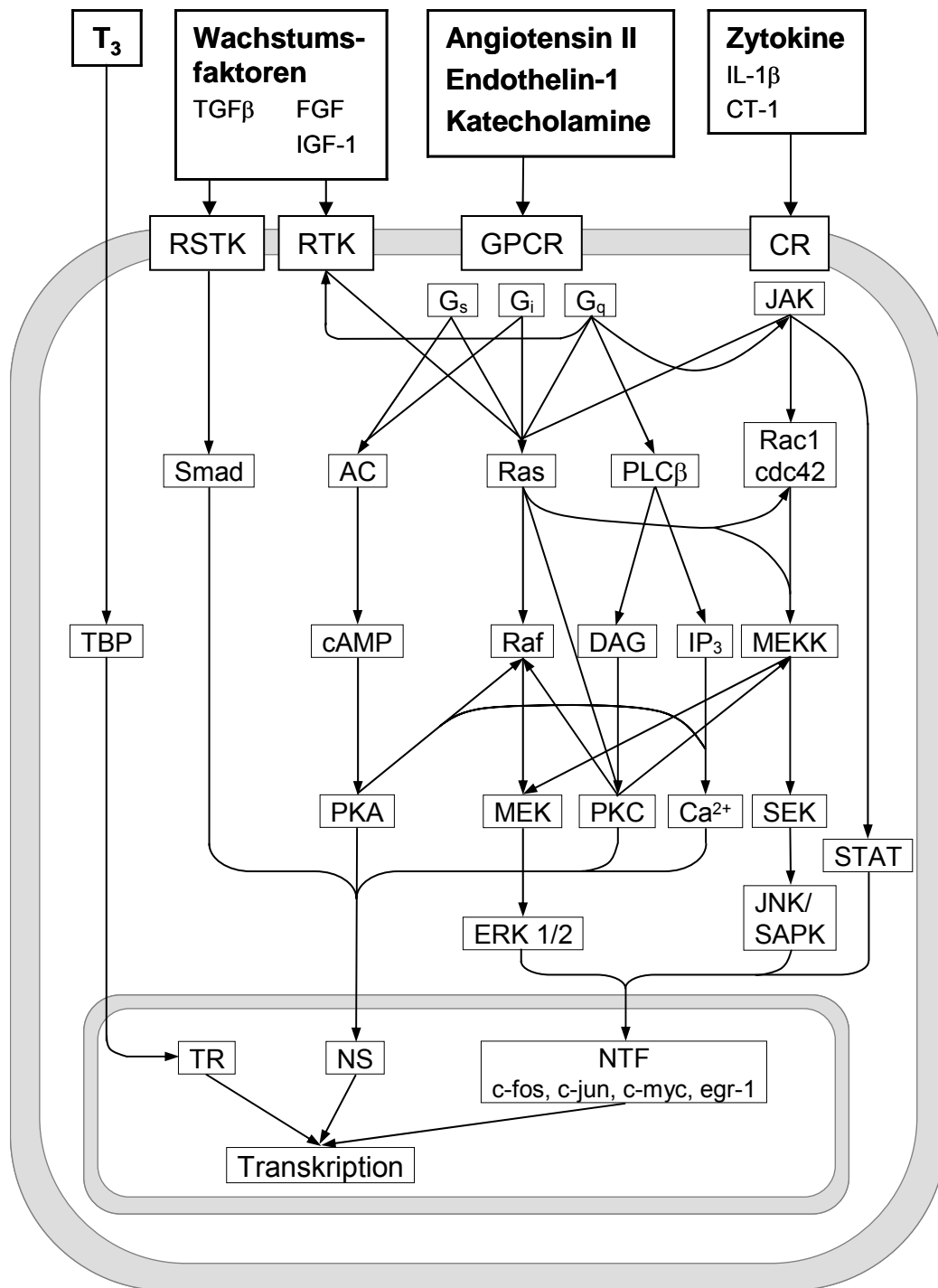


Abbildung 1: Die wichtigsten Signaltransduktionswege in der Hypertrophie (modifiziert nach Hefti et al. 1997).

Die beiden Proteinkinasen A und C haben eine Vielzahl zytosolischer und nukleärer Substrate. So sind beispielsweise beide in der Lage, die Kaskade der mitogen activated protein kinases (MAPK, s. u.) zu starten (Kolch 1993, Denhardt 1996, Yamazaki et al. 1997). Die Gruppe der Wachstumsfaktorrezeptoren lässt sich in zwei Subfamilien mit unterschiedlicher Kinase-Aktivität einteilen. Diejenigen mit Tyrosin-Kinase-Aktivität wirken unter anderem auf die monomere GTPase Ras (p21) und aktivieren die Phosphatidyl-3-OH-Kinase (PI3K), während Rezeptoren mit Serin/ Threonin-Kinase-Aktivität vor allem über die Familie der Smad-Transkriptionsfaktoren auf nukleäre Substrate wirken.

Zytokin-Rezeptoren wiederum nehmen über die Januskinase (JAK) Einfluss auf Proteine der Ras-Familie (Rac1, cdc42) und via STAT (signal transducer and activator of transcription) auf nukleäre Transkriptionsfaktoren.

Eine zentrale Rolle in der Mediation hypertropher Signale spielt die monomere GTPase Ras. Sie wird sowohl durch Zytokine und Wachstumsfaktoren als auch durch die Agonisten der G-Protein gekoppelten Rezeptoren aktiviert. Ihre Aufgabe besteht unter anderem in der Aktivierung einer der wichtigsten Signaltransduktionskaskaden in der Hypertrophie: die der mitogen activated protein kinases (MAPK, Abbildung 2). Diese modulieren durch Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten die Aktivität einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, wie z. B. c-jun, c-fos, ATF2, ternary complex factors (Elk1, SAP1a) und MEF2C. Man unterscheidet dabei drei MAPK-Subfamilien: 1. die extracellular signal regulated protein kinases 1/2 (ERK 1/2, auch: extracellularly responsive kinase, MAPK p44/42), 2. die c-jun N-terminal kinase/ stress-activated protein kinase (JNK/ SAPK) und 3. die p38 MAPK. Während die Hauptaufgabe der JNK/ SAPK und p38 MAPK vor allem in der Vermittlung pathologischen Stresses liegt, spielt die Gruppe der ERK eine herausragende Rolle in der Mediation anaboler Prozesse wie Hypertrophie, Zellteilung und -differenzierung (Yue et al. 2000). Die Aktivierung der MAPK erfolgt durch Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosin-Seitenketten (Thr-X-Tyr-Motiv) durch MAPK Kinasen (MAPKK), wie z. B. MEK 1/2 (mitogen activated ERK activating kinase) und SEK (SAPK Kinase), welche wiederum durch MAPKK Kinasen, wie MEKK und Raf, aktiviert werden.



Durch die zahlreichen Querverbindungen, die zwischen den einzelnen Signaltransduktionskaskaden bestehen, kommt es zu einer erheblichen Signalamplifikation, -modulation und -integration, am Ende derer die Beeinflussung der Aktivität zahlreicher nukleärer Transkriptionsfaktoren steht. Diese modulieren über die Bindung an Promoter- bzw. Enhancer-Regionen die Transkription einer Vielzahl von Genen.

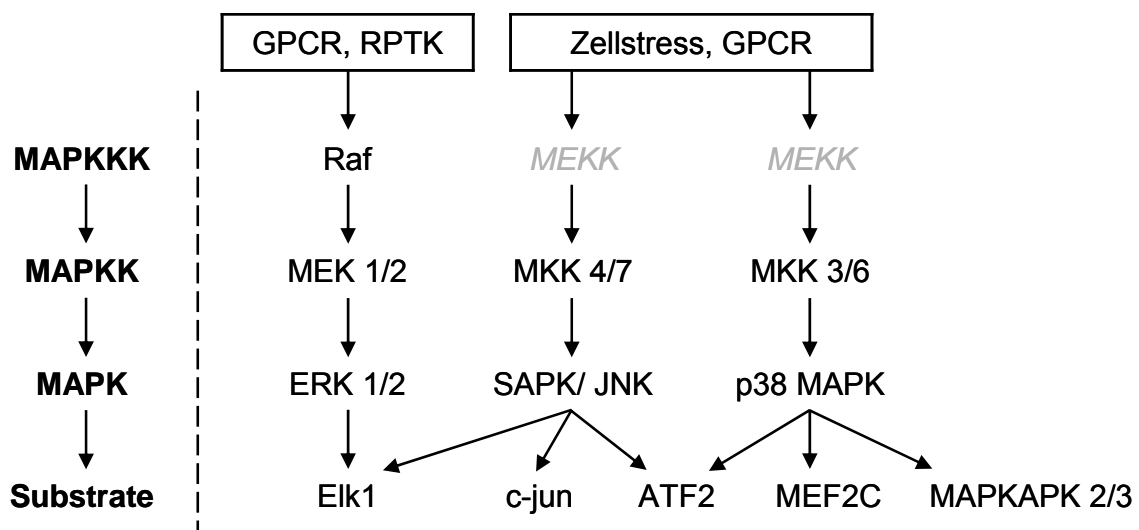


Abbildung 2: Die Kaskade der mitogen activated protein kinases (MAPK). Kur-siv: noch nicht identifiziert (modifiziert nach Sugden und Clerk 1998).

## 1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das Ubiquitin-Proteasom-System stellt den wichtigsten Abbauweg intrazellulärer Proteine dar; nahezu alle zum Abbau bestimmten Proteine werden über ihn de-gradiert (Rock et al. 1994). Dementsprechend sind Zellen ohne ein funktionieren-des Ubiquitin-Proteasom-System nicht lebensfähig (Tanaka 1995). Abgebaut wer-den zum einen „altersschwache“ Proteine im Rahmen des physiologischen Prote-inturnovers entsprechend der jeweiligen Proteinhalbwertszeit und zum anderen abnorme, durch Mutationen oder Synthesefehler entstandene Proteine. Des Wei-teren spielt das Proteasom durch die schnelle Degradation geschwindigkeitsbe-stimmender Enzyme (z. B. Ornithin-Decarboxylase), Transkriptionsfaktoren (z. B.

c-jun) und regulatorischer Proteine (z. B. Zykline) eine wichtige Rolle in der Regulation von Stoffwechsel, Transkription und Zellzyklus (Coux et al. 1996).

### 1.2.1 Markierung der Proteasomsubstrate mit Ubiquitin

Um zu gewährleisten, dass das Proteasom nur die zum Abbau bestimmten Proteine degradiert, werden diese mit einer Kette aus mindestens vier Ubiquitinmolekülen markiert (Voges et al. 1999) (Abbildung 3).

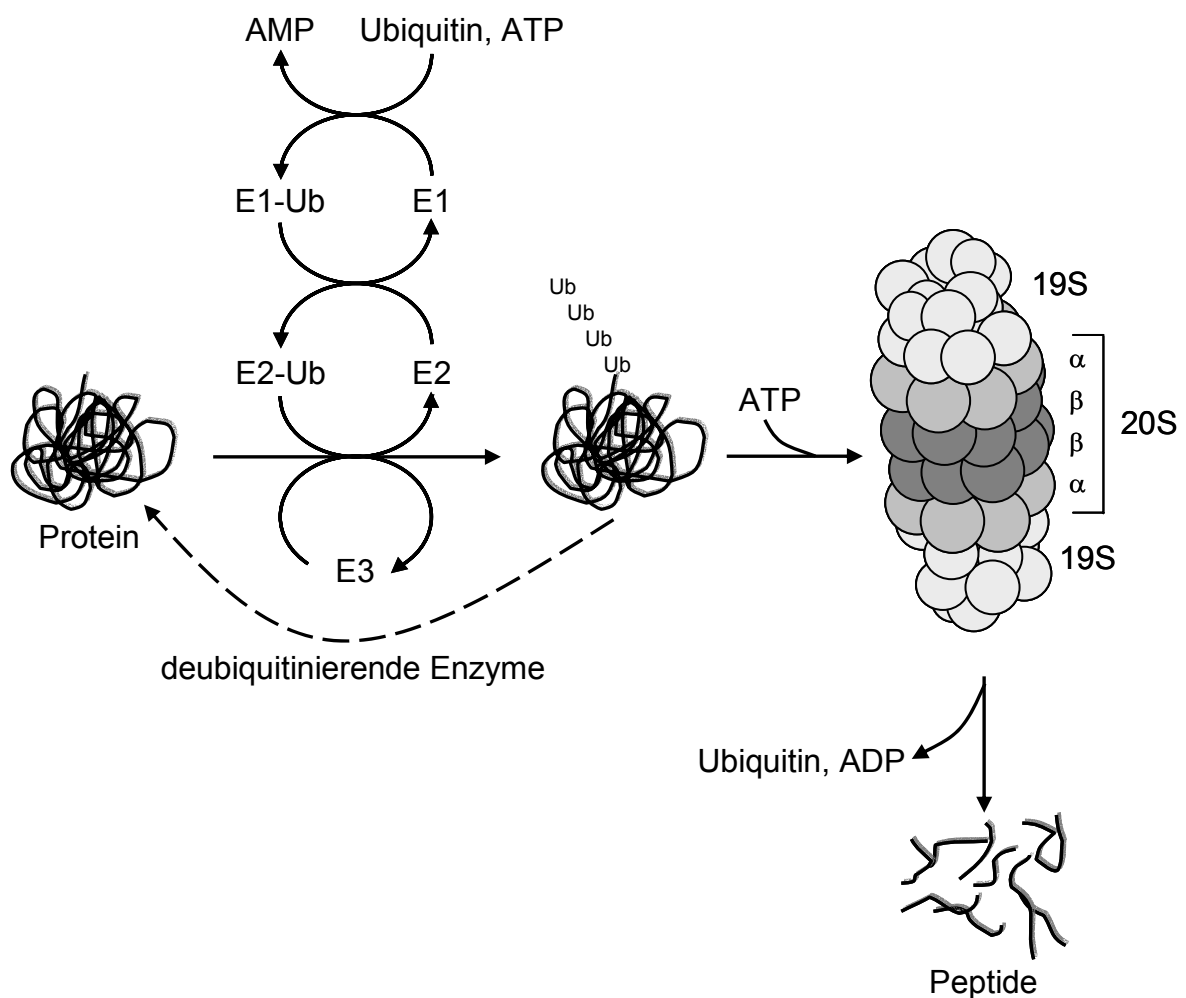


Abbildung 3: Das Ubiquitin-Proteasom-System (nach Coux et al. 1996).

Diese Markierung wird von drei Enzymen katalysiert. Zunächst wird das Ubiquitin, ein hochkonserviertes 8 kDa schweres Polypeptid, durch das Enzym E1 in einem

ATP-abhängigen Prozess aktiviert und auf das Ubiquitin carrier protein E2 übertragen. Eine Protein-Ligase E3 bindet das zu degradierende Protein und überträgt das Ubiquitin auf einen Lysinrest des Substrats bzw. eines bereits ans Protein gebundenen Ubiquitins (Glickman und Ciechanover 2002). Eukaryontische Zellen enthalten dabei möglicherweise mehrere hundert E3-Ligasen, die charakteristische Degradations-Signale der Proteine erkennen und so die Spezifität des Markierungswegs ermöglichen (Kisselev und Goldberg 2001). Vor der Degradation der Proteine durch das Proteasom werden die Ubiquitinmoleküle abgespalten und können so wiederverwendet werden.

### 1.2.2 Struktur des Proteasoms

Beim Proteasom handelt es sich um eine multikatalytische Peptidase, die polyubiquitinierte Proteine rasch in kleine Oligopeptide spaltet. Durch Bindung regulatorischer Proteine wie PA28 und PA700 an die Enden des katalytischen Kerns, dem 20S Proteasom, entstehen verschiedene Unterformen, die sich in Aufbau und Funktion unterscheiden (Tabelle 1) (Tanahashi et al. 2000).

Tabelle 1: Relativer Anteil der einzelnen Proteasomunterformen und der endogenen Aktivatoren PA28 und PA700 im Zytosol von HeLa-Zellen (Tanahashi et al. 2000).

Komplex	Anteil [%]
20S Proteasom	31 ± 4
PA700	10 ± 1
PA28	15 ± 10
PA28 – 20S – PA28	15 ± 7
PA700 – 20S – PA28	18 ± 7
PA700 – 20S – PA700 (26S Proteasom)	11 ± 2

Das 20S Proteasom ist ein zylinderförmiges, 700-750 kDa schweres Molekül mit

einem Durchmesser von 12 nm und einer Länge von 17 nm (Baumeister et al. 1988). Es besteht aus vier Ringen, die sich aus jeweils 7 Untereinheiten zusammensetzen (Zwickl et al. 1992). Dabei sind die beiden äußeren  $\alpha$ -Ringe ebenso wie die beiden inneren  $\beta$ -Ringe identisch, so dass ein 20S-Proteasom aus zwei gleichen Hälften besteht (Kopp et al. 1993). Während die  $\alpha$ -Untereinheiten eher eine strukturgebende Funktion erfüllen – nur sie können überhaupt Ringe formen – und des Weiteren eine physikalische Barriere für zytosolische Proteine bilden (Löwe et al. 1995), tragen jeweils drei Untereinheiten der  $\beta$ -Ringe die proteolytische Aktivität. Durch diese werden dem Proteasom zugeführte Proteine innerhalb von ein bis zwei Minuten in Oligopeptide von 7 bis 11 Aminosäuren Länge gespalten (Zwickl et al. 1994, Akopian et al. 1997). Dabei werden drei verschiedene Aktivitätstypen unterschieden: 1. die chymotrypsin-like Aktivität, die nach hydrophoben Residuen schneidet, 2. die trypsin-like Aktivität (nach basischen Residuen) und 3. die Postglutamylhydrolase-Aktivität (nach sauren Residuen, auch: caspase-like Aktivität) (Orlowski 1990, Rivett 1989). Weitere Aktivitätsarten werden diskutiert; so zum Beispiel eine BrAAP-Aktivität (branched-chain amino acid) und eine SNAAP-Aktivität (small neutral amino acid) (Orlowski et al. 1993). Im Gegensatz zu anderen Proteasen benutzen dabei alle proteolytisch aktiven Zentren des Proteasoms N-terminale Threoninreste als Nukleophile. Die entstehenden Oligopeptide können in der Folge durch zytosolische Exopeptidasen weiter abgebaut werden. Die Zusammensetzung der Untereinheiten des Proteasoms ist gewebe- und entwicklungsabhängig und wird präzise reguliert. So bewirkt beispielsweise Interferon  $\gamma$  den Austausch von 3  $\beta$ -Untereinheiten gegen LMP 2/7 (low molecular weight proteins) und MECL-1 (multicatalytic endopeptidase complex subunit) (Früh et al. 1994), die die proteasomale Aktivität zu Gunsten der Antigenpräsentation via MHC I – einer weiteren wichtigen Aufgabe des Proteasoms (Goldberg und Rock 1992) – verändern (Brown et al. 1993). Ebenso wie der Aufbau ist auch die Gesamtaktivität des Proteasoms einer genauen Regulierung unterworfen. So bewirken die endogenen Aktivatoren PA28 (Ma et al. 1992) und PA700 (auch: 19S-Regulatorprotein, Chu-Ping et al. 1994) eine Aktivitätserhöhung auf das 10- bis 50-fache. Als endogene Inhibitoren wirken dagegen die  $\delta$ -Aminolävulinsäure-Dehydratase (Murakami und Etlinger 1986, Guo und Etlinger 1994), PI31 (Chu-

Ping et al. 1992) und das Hitzeschockprotein Hsp70 (Tsubuki et al. 1994).

Bindet an jeden der äußeren  $\alpha$ -Ringe ein PA700-Molekül, entsteht das 2000-2500 kDa schwere, hantelförmige 26S Proteasom. PA700 besteht aus 2 Subkomplexen, der „base“ und dem „lid“. Während erstere die ATPase-Aktivität trägt und in der Lage ist, die Eintrittspforte der  $\alpha$ -Ringe zu öffnen und die abzubauenen Proteine zu entfalten (man spricht von einer „reverse chaperone activity“), hat der „Deckel“ die Aufgabe, die Substrate und Polyubiquitinketten zu erkennen und – vermutlich mit Hilfe einer Isopeptidase-Aktivität – vom Substrat abzuspalten (zur Übersicht siehe Deveraux et al. 1994, van Nocker et al. 1996, Ferrell et al. 2000).

### 1.2.3 Aufgaben des Proteasoms

Neben seiner eigentlichen Hauptaufgabe, dem Abbau abnormer und altersschwacher Proteine, ist das Proteasom durch die schnelle Degradation von geschwindigkeitsbestimmenden Enzymen, Mediatorproteinen und Transkriptionsfaktoren in der Lage, regulatorisch auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse einzuwirken (Tabelle 2).

So kann das Proteasom unter anderem aus inaktiven Vorläufer-Proteinen aktive Proteine schneiden, ohne diese komplett abzubauen (limitierte Proteolyse). Dies ist beispielsweise von großer Bedeutung bei der Synthese und Aktivitätsregulation des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, der einen erheblichen regulierenden Einfluss auf die Expression vieler für Entzündungsreaktionen wichtiger Mediatoren (TNF $\alpha$ , IL-1), Enzyme (Cyclooxygenase, NO-Synthetase) und Leukozyten Adhäsionsmoleküle (ICAM, VCAM) ausübt (Read et al. 1995, Pahl 1999). So entsteht die p50-Untereinheit von NF $\kappa$ B durch limitierte Proteolyse eines 105 kDa schweren Vorläufer-Proteins (Fan und Maniatis 1991). Auch an der Aktivierung von NF $\kappa$ B ist das Proteasom entscheidend beteiligt. Die inaktive Form des Transkriptionsfaktors liegt im Zytosol gebunden an das Inhibitorprotein I $\kappa$ B vor. Durch proinflammatorische Signale wie z. B. TNF $\alpha$  kommt es zum schnellen proteasomalen Abbau von I $\kappa$ B, woraufhin das nun aktive NF $\kappa$ B in den Zellkern transloziert wird (Palombella et al. 1994).

Des Weiteren nimmt das Proteasom durch den Abbau von Zyklinen und Inhibitoren der cyclin dependent kinases (CDK) Einfluss auf den Zellzyklus (Koepp et al. 1999). Ferner ist es über den Abbau von Transkriptionsfaktoren wie c-jun, E2F-1 und  $\beta$ -catenin an der Regulation von Zellwachstum und Genexpression (Hershko und Ciechanover 1998) und durch Abbau aktivierter Proteinkinasen (z. B. src und Proteinkinase C) an der Beendigung von Signalkaskaden beteiligt (Harris et al. 1999, Lu et al. 1998). Tumorgenese (Hershko und Ciechanover 1998, Pagano et al. 1995), Antigenpräsentation via MHC I (Rock und Goldberg 1999) und Muskelatrophie (Mitch und Goldberg 1996) sind weitere zelluläre Prozesse, in denen das Proteasom eine wichtige Rolle spielt.

Tabelle 2: Physiologische Funktionen und wichtige Substrate des Proteasoms (modifiziert nach Kisselev und Goldberg 2001).

Funktion	Substrat
Zellzyklusprogression	p27 <sup>Kip1</sup> , p21, Zyklone
Onkogenese	p53, p27 <sup>Kip1</sup> , bax, I $\kappa$ B
Apoptose	Bcl-2, cIAP, XIAP
Regulation der Genexpression	c-jun, E2F1, I $\kappa$ B, $\beta$ -catenin
Entzündung	I $\kappa$ B, p105-Vorläufer von NF $\kappa$ B
Langzeitgedächtnis	Proteinkinase A (regulatorische Untereinheit)
MHC I-Präsentation	die meisten intrazellulären Proteine
Proteinqualitätskontrolle	CFTR $\Delta$ F508, $\alpha_1$ -Antitrypsin, Calmodulin

#### 1.2.4 Selektive Proteasominhibitoren

Als große Hilfe in der Aufklärung der Funktion des Proteasoms erwiesen sich in den letzten Jahren synthetisch hergestellte, selektive Proteasominhibitoren.

Da bereits die Inhibition der chymotrypsin-like Aktivität genügt, um einen Großteil des Proteinabbaus zu hemmen (Rock et al. 1994), und die Hemmung der trypsin-like und der Postglutamyldrolase-Aktivität keinen großen Einfluss auf die Ge-

samtproteolyse hat (Kisselev et al. 1999), interferieren die meisten Proteasominhibitoren vor allem mit der chymotrypsin-like Aktivität (Kisselev und Goldberg 2001).

Unterteilen lassen sich die synthetischen Proteasominhibitoren in Peptidaldehyde, -boronate, -vinylsulfone, -epoxyketone und Nicht-Peptide (z. B. Lactacystin).

Die ersten synthetisch hergestellten Proteasominhibitoren waren Peptidaldehyde (Rock et al. 1994). Sie sind gekennzeichnet durch eine hohe Zellpermeabilität und schnellen zellulären Abbau (Vinitsky et al. 1992). Ihr Wirkprinzip beruht auf der Ausbildung einer reversiblen Hemiacetalbindung mit der Hydroxylgruppe des N-terminalen Threonins der die Aktivität tragenden  $\beta$ -Untereinheit. Sie sind imstande, alle Aktivitätstypen zu inhibieren, wirken jedoch am stärksten an der chymotrypsin-like Aktivität. Aufgrund seiner Potenz und der hohen Selektivität für das Proteasom – Kalpaine und Kathepsine werden erst bei mindestens 10fach höherer Dosierung inhibiert (Tsubuki et al. 1996) – erwies sich das auch in dieser Arbeit verwendete MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO, Abbildung 4) als günstigster Vertreter der Peptidaldehyde (Kisselev und Goldberg 2001). Die Mitglieder der Gruppe der Peptidboronate, wie z. B. MG262 (Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)<sub>2</sub>, Abbildung 4) zeichnen sich gegenüber den Aldehyden durch eine höhere Spezifität für das Proteasom und eine deutlich höhere Potenz aus. Als die Gruppe mit der höchsten Spezifität für das Proteasom gelten die Epoxyketone (z. B. Epoxomicin).

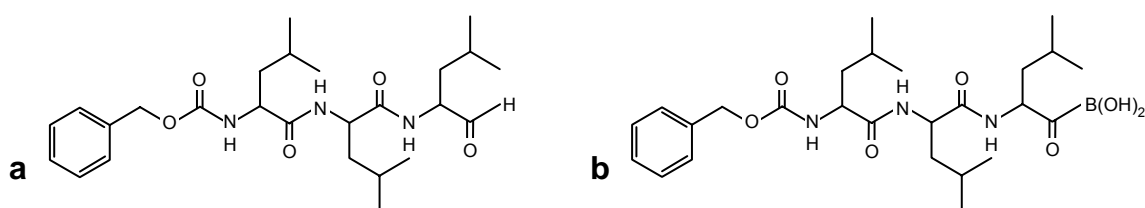


Abbildung 4: Strukturformeln der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Proteasominhibitoren. a: MG132, b: MG262.

Aus dem verminderten Proteinabbau ergeben sich zahlreiche Konsequenzen. So kommt es innerhalb von kurzer Zeit zu einer Anhäufung kurzlebiger, polyubiquiti-

nierter Proteine (Vinitsky et al. 1994). Des Weiteren akkumulieren fehlgefaltete und beschädigte Proteine, die bis zu einem Drittel aller neusynthetisierten Proteine ausmachen können (Schubert et al. 2000). Diese Anhäufung induziert vermutlich die Expression von Hitzeschock- und Stressproteinen des endoplasmatischen Retikulums (Bush et al. 1997). Des Weiteren kommt es zu Veränderung der Expression zahlreicher Gene, die u. a. Proteasomuntereinheiten und Enzyme des Aminosäurestoffwechsels codieren (Zimmermann et al. 2000). Durch Expressionsanalysen des gesamten Genoms von *Saccharomyces cerevisiae* nach Behandlung mit PS-341 konnte eine Vielzahl weiterer durch die Inhibition des Proteasoms beeinflusster Gene identifiziert werden. Es zeigte sich eine Steigerung der Expression von Genen, die Untereinheiten des Proteasoms codieren und die bei der Substrat-Ubiquitinierung, der Proteinfaltung, der Reaktion auf Zellstress, im Kohlenhydratstoffwechsel und in der DNA-Reparatur eine wichtige Rolle spielen. Demgegenüber verringerte sich die Transkription von Genen des Aminosäurestoffwechsels, der Proteinsynthese, der Fettsäuresynthese und des Transportsystems für kleine Moleküle (Fleming et al. 2002).

Bei längerer Inkubation induzieren Proteasominhibitoren Apoptose, wobei proliferierende Zellen empfindlicher zu reagieren scheinen als postmitotische (Kisselev und Goldberg 2001). Ursache für die Induktion von Apoptose könnte die Akkumulation kritischer Proteine wie des Tumorsuppressorproteins p53 (Lopes et al. 1997) und des cyclin dependent kinase inhibitors p27 (Pagano et al. 1995) sein. Weiterhin kann die Anhäufung fehlgefalteter Proteine die SAPK/ JNK-Kaskade, die ebenfalls in der Lage ist, Apoptose auszulösen, in Gang setzen (Meriin et al. 1998). Interessanterweise kann im Gegensatz dazu eine Inkubationsdauer von weniger als 16 Stunden nicht-proliferierende Thymozyten und neuronale Zellen vor Apoptose schützen. Dies könnte wiederum seine Ursache in der Stabilisierung von Inhibitoren der Apoptose wie bcl-2 haben (Kisselev und Goldberg 2001). Ein weiterer wichtiger Effekt der Proteasominhibitoren ist ihre antiinflammatorische Wirkung durch Stabilisierung des Inhibitorproteins I $\kappa$ B des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, der in der Mediation von Entzündungsreizen eine wichtige Rolle spielt (s. o.).



### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

In unserem Labor ist ein Hypertrophie-Modell mit neonatalen Rattenkardiomyozyten etabliert: Behandlung mit hypertrophen Stimuli führt innerhalb von 48 Stunden zur Hypertrophie der Primärzellen. Dabei fiel zunächst auf, dass die gleichzeitige Behandlung mit Proteasominhibitoren das Wachstum der Zellen unterdrückt. Im folgenden durchgeführte Vorversuche, in denen mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion der verminderte Gehalt an mRNA von Hypertrophie-Markern gezeigt werden konnte, gaben weitere Hinweise auf eine supprimierte Induzierbarkeit der Hypertrophie kardialer Myozyten durch Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems.

Daraufhin galt es im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des Hypertrophie-Modells, sowohl die verringerte Flächenzunahme der Myozyten zu quantifizieren als auch die typischen Charakteristika der Hypertrophie auf subzellulärer Ebene, wie Gehalt an Markerproteinen, Genexpression und Protein- und RNA-Synthese, zu untersuchen. Des Weiteren wurden zur Aufklärung möglicher Mechanismen der Proteasomihibitor-vermittelten Hypertrophiesuppression Aktivitätsanalysen von MAP Kinasen und Transkriptionsfaktoren vorgenommen.

## **2 Materialien und Methoden**

Alle Experimente wurden mit neonatalen Rattenkardiomyozyten (Primärzellen) durchgeführt. Soweit nicht gesondert erwähnt, wurden alle Standardsubstanzen und Chemikalien von den Firmen Sigma und Merck bezogen.

### **2.1 Zellkultur und -präparation**

#### **2.1.1 Materialien**

- CMF-HBSS Hanks balancierte Salzlösung  
ohne Kalzium und Magnesium GibcoBRL Life Technologies
- L-15 (Leibovitz) Medium mit L-Glutamin und  
L-Aminosäuren GibcoBRL Life Technologies
- M199 Medium mit 1,25 g/l NaHCO<sub>3</sub>, L-  
Glutamin und L-Aminosäuren GibcoBRL Life Technologies
- Cytosin-β-D-arabinofuranosid (Ara-C, 10 mM  
in PBS) Sigma
- Serum neugeborener Kälber (NBCS), 30 min  
bei 56°C inaktiviert GibcoBRL Life Technologies
- Trypsin-EDTA in HBSS ohne Ca<sup>2+</sup>/ Mg<sup>2+</sup> GibcoBRL Life Technologies
- Trypsin-Inhibitor (Sojabohne, 2 mg/ ml in  
HBSS) Cell Systems
- Worthington Kollagenase Typ 2 (215 U/ g),  
70 mg in 50 ml L-15 Medium Cell Systems
- Fibronectin (10 µg/ ml, gelöst in H<sub>2</sub>O mit  
0,2% Gelatine) Promocell
- Trypanblau, 0,4% in PBS ICN Biochemicals
- Zellsieb, 70 µm, Nylon Falcon
- Zentrifugenröhrchen, 50 ml Falcon

## Materialien und Methoden

---

- Zellkulturschale, 20 x 100 mm Falcon
- Zellkulturflasche, 750 ml, 175 cm<sup>2</sup> Falcon
- Zellkulturplatte, 6 Vertiefungen, Flachboden, 9,6 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche Falcon
- Wasserbad 1092 GFL
- Zentrifuge 5810R Eppendorf
- Laminarbox LaminAir HBB 2448 Heraeus Instruments
- Function line CO<sub>2</sub>-Inkubator Heraeus Instruments
- Mikroskop Axiovert 25 Zeiss
- Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS): 137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,3 (HCl)

### 2.1.2 Zellkultur

Als Standardmedium diente Medium M199, dem 0,1 mg/ ml Penicillin-Streptomycin zugesetzt wurde. Grundsätzlich wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen (wells) kultiviert. Um bakterielle Kontamination zu vermeiden, wurde an einer Werkbank mit laminarer Luftströmung gearbeitet.

### 2.1.3 Zellpräparation

Zur Gewinnung der neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden 2-3 Tage alte Wistarratten durch Genickbruch getötet, mit 70% Ethanol desinfiziert und anschließend thorakotomiert. Nach Entnahme der Herzen, Abpräparation der Vorhöfe und einem Waschschrift in 40 ml eiskaltem HBSS wurden die Ventrikel in ca. 1

mm<sup>3</sup> große Stücken geschnitten. Diese wurden 18-20 Stunden mit 50 µg/ ml Trypsin (1 ml Trypsin-EDTA in 9 ml HBSS bei 10 Herzen) bei 4°C in einer Zellkulturschale inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1 ml Trypsin-Inhibitor hinzugesetzt, die Schale 30 Sekunden geschwenkt und 5-7 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml Kollagenase wurde die Lösung 30-45 Minuten bei 37°C im Wasserbad geschwenkt. Nun wurden die angedauten Herzstückchen durch vorsichtiges Auf- und Niederpipettieren mit einer 10 ml-Pipette weiter verkleinert. Zum Absetzen der unverdauten Gewebereste wurde die Zellsuspension fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, dann der Überstand abgenommen und mit dem zuvor mit 1 ml L-15 angefeuchteten 70 µm-Zellsieb filtriert. Die übrigen Gewebereste wurden in 5 ml L-15 Medium resuspendiert und auf- und niederpipettiert. Nach erneutem Absetzen der ungelösten Reste wurde der Überstand im Zellsieb filtriert. Im Anschluss wurde das Zellsieb mit 2 ml L-15 Medium gespült. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen 5 Minuten bei 83 x g (700 U/ min) zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 25 ml Medium M199 mit 10% NBCS, 10 µM Ara-C und Penicillin-Streptomycin resuspendiert. Um einen möglichst hohen Anteil an kardialen Myozyten zu erreichen, wurde die Zellsuspension eine Stunde in einer 750 ml-Zellkulturflasche (175 cm<sup>2</sup>) bei 37°C präplattiert. Dabei setzen sich andere Zelltypen wie zum Beispiel Fibroblasten deutlich schneller ab. Nach Abnahme und Durchmischen des Überstands wurden die Zellen in einer Neubauerkammer gezählt. Dafür wurde einem Aliquot Zellsuspension Trypanblau im Verhältnis 1:10 zugesetzt, um lebende von toten Zellen, die den Farbstoff inkorporieren, unterscheiden zu können. Daraufhin wurden die Zellen in Fibronectin-beschichteten Zellkulturschalen (sechs 35 mm-Vertiefungen, 9,6 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) mit einer Dichte von ~2000 Zellen/ mm<sup>2</sup> (1,2-1,5 x 10<sup>6</sup>/ well) ausplattiert. Das dem M199 hinzugefügte Spindelgift Ara-C hatte die Aufgabe, den Anteil teilungsfähiger Zellen weiter zu reduzieren. Nach 24 Stunden Inkubation unter Standardbedingungen wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und auf serum- und Ara-C-freies M199 umgestellt.

### 2.2 Zellstimulation

#### 2.2.1 Materialien

##### 2.2.1.1 Agonisten

- Isoproterenol (10 mM in H<sub>2</sub>O) Sigma
- Angiotensin II (100 mM in H<sub>2</sub>O) Sigma
- Phenylephrin (100 mM in H<sub>2</sub>O) Sigma
- Fetales Kälberserum (FCS) Biochrom KG

##### 2.2.1.2 Inhibitoren

- MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO, 10 mM in Dimethylsulfoxid) Biomol
- MG262 (Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)<sub>2</sub>, 10 mM in Dimethylsulfoxid) Biomol
- ALLM (N-Ac-Leu-Leu-methional, 10 mM in Dimethylsulfoxid) Calbiochem

#### 2.2.2 Durchführung

24 Stunden nach dem Ausplattieren wurden die Zellen dreimal mit je 2 ml PBS/ well gewaschen, auf Standardmedium umgestellt und für weitere 24 Stunden inkubiert. Daraufhin wurden die Agonisten bzw. Inhibitoren entsprechend der jeweiligen Experimente hinzugegeben. Die Kontrollen wurden mit den entsprechenden Lösungsmitteln behandelt.

Als hypertrophe Stimuli wurden Isoproterenol, ein synthetisches  $\beta$ -Sympathomimetikum, Phenylephrin, ein synthetisches  $\alpha$ -Sympathomimetikum, und Angiotensin II, ein physiologisches Peptidhormon des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, verwendet. Des Weiteren wurde fetales Kälberserum (FCS), das zahlreiche Hypertrophie-induzierende Botenstoffe enthält, eingesetzt.

Zur Hemmung des Proteasoms wurden die selektiven, zellmembranpermeablen, reversiblen Proteasominhibitoren MG132 ( $K_i = 4$  nM) und MG262 ( $K_i = 0,03$  nM)

eingesetzt. Um zu zeigen, dass die beobachteten Effekte ihre Ursache in der spezifischen Hemmung des Proteasoms hatten, wurden zum Vergleich zytoplasmatische Proteasen (Kalpain I und II, Kathepsin B und L) mit dem zellpermeablen Inhibitor ALLM gehemmt.

### 2.3 Zellyse und Proteinextraktion

#### 2.3.1 Materialien

- RIPA-Puffer: 150 mM NaCl  
1% NP40  
0,5% Natriumdesoxychelate  
0,1% Natriumdodezylsulfat (SDS)  
50 mM Tris  
pH 8 (HCl)
- Proteinextraktionspuffer: 4% complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)  
in RIPA
- ERK-Extraktionspuffer: 4% complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)  
10 mM NaF  
1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>  
in RIPA
- Zentrifugenröhrchen, 12 ml Falcon
- Zentrifugenröhrchen, 1,5 ml Eppendorf

#### 2.3.2 Durchführung

##### 2.3.2.1 Zellyse nach Langzeitstimulation

Die Zellen wurden dreimal mit 2 ml PBS/ well gewaschen. Zum Ablösen der Zellen von der Kulturschale wurden sie nach vollständigem Absaugen des PBS 5-7 min bei 37°C mit 400 µl Trypsin pro well inkubiert. Nun wurden 6 ml M199 mit 10% NBCS hinzugegeben und die Zellsuspension in 12 ml-Zentrifugenröhrchen über-

führt. Nach zehn Minuten Zentrifugieren bei 119 x g (1000 U/ min) wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert (10 min, 119 x g) und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde nun in 50 µl Proteinextraktionspuffer resuspendiert und in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Um Zelldebris zu pelletieren, wurde das Zelllysate nach 30 Minuten Inkubation bei 4°C mit 15.000 x g (14.000 U/ min) für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -70°C eingefroren.

### *2.3.2.2 Zelllyse nach Kurzzeitstimulation*

Die Kurzzeitstimulationen dienten der Untersuchung des Aktivierungszustandes der zur Familie der mitogen activated protein kinases gehörenden extracellular signal regulated kinases 1/2 (ERK, MAPK p44/42). Diese Enzyme werden durch Phosphorylierung aktiviert. Da die inaktivierenden Phosphatasen der Zellen äußerst schnell arbeiten, musste die Lysezeit möglichst kurz gehalten werden. Darüber hinaus wurden dem Lysepuffer Phosphatase-Inhibitoren (NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) zugesetzt

Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit 2 ml PBS pro well gewaschen, mit 150 µl ERK-Extraktionspuffer überschichtet und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen abgeschabt, in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und weitere 15 Minuten auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde das Zelllysate 20 Minuten bei 15.000 x g (14.000 U/ min) bei 4°C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und ebenfalls bei -70°C eingefroren.

## **2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration**

### 2.4.1 Materialien

- Coomassie Plus Protein Assay Reagent Pierce
- PS Microplatte 96 well Greiner Labortechnik
- Bovines Serumalbumin (BSA) Sigma
- Photometer anthos htIII anthos labtec instruments
- WinRead 2.0 anthos labtec instruments

### 2.4.2 Durchführung

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode. Von den Proteinextrakten wurden 2 µl Aliquots abgenommen und in 18 µl Aqua bidest. gelöst. 10 µl dieser Lösung wurden zu 200 µl Coomassie-Reagenz in einer 96-Loch-Platte gegeben. Nach vorsichtigem Schwenken der Platte wurden die Proben zügig im Photoextinktiometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Das Messprinzip beruht auf einem Proteinkonzentrations-abhängigen Farbumschlag von dunkelgrün zu blau (Absorptionswechsel von 465 zu 595 nm), der durch Bildung von Coomassie-Protein-Komplexen entsteht. Gemessen wurde grundsätzlich in Doppelwerten; zur Ermittlung einer Eichkurve dienten Proteinstandards aus bovinem Serumalbumin in einer Konzentration von 0,1-0,7 µg/ µl. Als Leerwert wurde reines Coomassie verwendet. Die Auswertung der gewonnenen Extinktionswerte erfolgte mit der Software WinRead 2.0.

## **2.5 Western Blots**

### 2.5.1 Materialien

- Acrylamid (aus Acrylamid und Bisacrylamid),  
Rotiporese Gel 29:1 (40%) Carl Roth GmbH & Co.
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Serva Feinbiochemica



## Materialien und Methoden

---

- N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) Sigma
- Ammoniumperoxydisulfat (APS) Sigma
- Proteinmarker, 6,5-175 kDa New England Biolabs
- Tischmixer Vortex-Genie 2 Scientific Industries
- Tischzentrifuge 5415C Eppendorf
- Elektrophoresekammern Sigma-Aldrich Techware
- Elektrophorese Stromversorgungsgerät  
EPS 600 Pharmacia Biotech
- Roti-Block Carl Roth GmbH & Co.
- Blotkammer: Semi-Dry Transfer Cell Trans-  
Blot SD Bio-Rad
- Thermomixer 5437 Eppendorf
- Wippe Biometra WT12 Biometra
- Enhanced Chemiluminescence Lösung Amersham
- Film X-Omat Blue XB-1, 18 x 24 cm Kodak
- Entwicklermaschine Hyperprocessor Amersham
- Scanner ScanMaker 4 Microtek
- Densitometrie ImageMaster 1D Prime, Version  
2.01, © 1996-97 Nonlinear Dynamics, Ltd. Hoefer Pharmacia Biotech

### 2.5.1.1 Lösungen

- Tris gepufferte  
Salzlösung (TBS): 50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  
150 mM NaCl  
pH 7,4 HCl
- 5x SDS-  
Probenpuffer: 60 mM Tris pH 6,8  
25% Glycerol (Sigma)  
5%  $\beta$ -Mercaptoethanol (Serva)  
2% SDS  
0,1 % Bromphenolblau (Serva)
- SDS-Laufpuffer: 2,5 mM Tris  
19,2 mM Glycin  
0,01% SDS  
pH 8,8
- Transferpuffer: 20% Methanol  
2 mM Tris  
15 mM Glycin
- Waschpuffer: 0,02% Tween 20 (Aldrich) in TBS
- Blockpuffer: 5% Skim Milk (Difco)  
0,01% Gelatine (Merck)  
1% BSA (Sigma)  
0,02% Tween 20 (Aldrich)
- Strip-Lösung: 0,2 M Glycin/ HCl pH 2,4  
0,1% SDS  
1% Tween 20

Tabelle 3: Erstantikörper

Antikörper, Eigenschaften	Verdünnung	eingesetzte Proteinmenge	Hersteller
<i>βMHC</i> Maus, monoklonal, IgG1, Klon: A4.951	1:100	40 µg	Alexis Biochemicals
<i>ERK 1/2 (p44/42 MAPK)</i> Kaninchen, monoklonal, Thr 202/ Tyr 204	1:1000	30 µg	Cell Signaling Technology, New England Biolabs Inc.
<i>phospho-ERK 1/2</i> Maus, monoklonal, Thr 202/ Tyr 204, spezifisch für phosphorylierte ERK 1/2	1:1000	30 µg	Cell Signaling Technology, New England Biolabs Inc.
<i>α-smooth muscle actin</i> Maus, monoklonal, IgG2a	1:500	20 µg	Sigma
<i>α-sarcomeric actin</i> Maus, monoklonal, Klon: 5C5	1:500	10 µg	Sigma
<i>Ubiquitin</i> Kaninchen	1:1000	40 µg	Dako

Tabelle 4: Zweitantikörper

Antikörper	Eigenschaften	Verdünnung	Hersteller
anti-Maus	Esel, IgG Meerrettich-Peroxidase konjugiert	1:10.000	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., via Dianova
anti-Kaninchen	Esel Meerrettich-Peroxidase konjugiert	1:10.000	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., via Dianova

### 2.5.2 Durchführung

Western Blots ermöglichen den quantitativen Nachweis spezifischer Proteine. Dafür werden diese zunächst durch Aufkochen und Zugabe von Natriumdodezylsulfat (SDS) denaturiert. Das negativ geladene SDS, welches sich proportional zum Mo-

lekulargewicht der Proteine an diese bindet, verleiht den Proteinen eine negative Außenladung. Dies ermöglicht das Auftrennen der Proteine nach ihrer Größe in einer Gelelektrophorese nach Laemmli, bei welcher die Proteine in einem elektrischen Feld wandern. Anschließend werden die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) übertragen („geblottet“) und mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen.

### 2.5.2.1 Präparation der Polyacrylamidgele

Da die eingesetzte Acrylamidkonzentration den Vernetzungsgrad der Gele und somit die Laufeigenschaften der Proteine beeinflusst, wurde sie an die Größe der nachzuweisenden Proteine angepasst. Für Western Blots Analysen von ERK 1/2 wurden 12%-Gele verwendet. Die Quantifizierung von  $\beta$ -myosin heavy chain,  $\alpha$ -sarcomeric actin,  $\alpha$ -smooth muscle actin und Ubiquitin erfolgte unter Einsatz von 8%-Gelen. Tabelle 5 gibt hierzu die Zusammensetzung der jeweiligen Gele wider.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

	8%-Trenngel	12%-Trenngel	Sammelgel
40% Acrylamid	5 ml	7,5 ml	2,5 ml
1,5 M Tris pH 8,8	6,25 ml	6,25 ml	–
1 M Tris pH 6,8	–	–	2,5 ml
H <sub>2</sub> O	13,25 ml	10,8 ml	14,6 ml
10% SDS	0,25 ml	0,25 ml	0,2 ml
APS	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
TEMED	12 $\mu$ l	8 $\mu$ l	20 $\mu$ l

### 2.5.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Eine vom nachzuweisenden Protein abhängende Proteinmenge wurde ad 20  $\mu$ l in RIPA gelöst und mit 5  $\mu$ l 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Nach fünfminütigem Erhit-

zen bei 95°C im Thermocycler wurden die Proben kurz anzentrifugiert, abgekühlt und in die Geltaschen pipettiert. Nun wurde die Elektrophorese bei 20 mA/ Gel gestartet. Je nach Proteingröße und Geltyp dauerte die Proteinauftrennung eine bis anderthalb Stunden. Daraufhin wurden die Gele aus den Kammern entnommen, zurechtgeschnitten und mit Blotpuffer inkubiert.

### 2.5.2.3 Blotten

Hierbei wurden die im Gel aufgetrennten Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF) übertragen. Dazu wurden eine PVDF-Membran und sechs Whatman-Papiere auf etwa Gelgröße zurechtgeschnitten. Zur Aktivierung wurde die PVDF-Membran eine Minute in Methanol, zwei Minuten in Aqua bidest. und fünf Minuten in Blotpuffer geschwenkt. Die Whatmanpapiere wurden ebenfalls mit Blotpuffer angefeuchtet.

Nun wurden drei Whatmanpapiere auf den als Anode dienenden Boden der Blotkammer gelegt, darauf die PVDF-Membran, darauf das Gel und abschließend kathodenseitig wieder drei Whatmanpapiere. Für das elektrische Feld wurde ein konstanter Strom von 350 mA über ein bis anderthalb Stunden gewählt.

### 2.5.2.4 Antikörperbindung

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die PVDF-Membranen zu verhindern, wurden die Membranen zwei Stunden bei Raumtemperatur in 10 ml Western Blot Block Puffer (MAPK-Blots in Roti Block) geschwenkt. Dieser enthält eine hohe Konzentration unspezifischer Proteine, die die freien Bindungsstellen auf der PVDF-Membran besetzen. Daraufhin wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit den entsprechenden, in Blockpuffer gelösten Antikörpern (siehe Tabelle 3) unter leichtem Schwenken inkubiert.

Am Folgetag wurden die Membranen 40 Minuten mit 10 ml Western Blot Waschpuffer (viermaliger Pufferwechsel) gewaschen und danach zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einer Wippe mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach einer

weiteren Waschphase über 60 Minuten (viermaliger Pufferwechsel) wurden die Membranen eine Minute in der Enhanced Chemiluminescence Lösung (ECL) geschwenkt und kurz mit Western Waschpuffer gespült. Die am zweiten Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase oxidiert das Luminol des ECL. Das durch die Oxidation angeregte Luminol fällt anschließend unter Lichtemission in den Grundzustand zurück. Das ausgesandte Licht wurde mittels Filmauflage registriert. Die entwickelten Filme wurden am Computer gescannt und mit der Software ImageMaster 1D densitometrisch ausgewertet.

### 2.5.2.5 Strippen der Western Blots

Bei Western Blot Analysen des Aktivierungszustands der ERK 1/2 wurde zunächst die Menge der phosphorylierten Enzyme bestimmt. Im Anschluss wurden die Membranen „gestrippt“, d. h. die Antikörperbindungen wurden wieder gelöst, so dass durch Inkubation mit dem Erstantikörper gegen nicht-phosphorylierte ERK deren Menge zum späteren Abgleich quantifiziert werden konnte. Dazu wurden die Membranen eine Stunde in Strip-Lösung geschwenkt und anschließend zweimal für 5 Minuten mit Western Blot Waschpuffer gewaschen. Im Weiteren konnte das oben beschriebene Protokoll (ab Blockieren in Blockpuffer) angewendet werden.

## 2.6 Morphometrie

### 2.6.1 Materialien

- Phalloidin, FITC- oder TRITC-konjugiert (1 µg/ µl in Methanol) Sigma
- Paraformaldehyd (PFA, 4% in PBS) Sigma
- Fluoreszenzmikroskop Axiovert S100 Zeiss
- Filter: G 365 FT 395 LP 420; I 450-490 FT 510 515-565; III BP 546 FT 580 LP 590 Zeiss

- Kamera: Sony MC-3254 Sony
- Morphometrie-Software Scion Image Beta 4.0.2, © 2000,  
basierend auf NIH Image von Wayne Rasband Scion Corporation
- Permeabilisierungspuffer: 1% t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton)  
50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  
150 mM NaCl  
pH 7,4 HCl

### 2.6.2 Durchführung

#### 2.6.2.1 Phalloidininfärbung

Um eine Computer-gestützte Morphometrie zu ermöglichen, wurden die Zellen mit Phalloidin gefärbt. Dabei handelt es sich um ein Gift des Pilzes *Amanita phalloides*, das in Muskelzellen an das F-Aktin bindet. An das verwendete Phalloidin war entweder der fluoreszierende Farbstoff FITC (Erregung bei 495 nm, Emission bei 513 nm) oder der ebenfalls fluoreszierende Farbstoff TRITC (Erregung bei 540-545 nm, Emission bei 570-573 nm) gebunden. Die Zellen wurden 48 Stunden nach Beginn der Stimulation zweimal mit 2 ml PBS pro well gewaschen und 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 1 ml Paraformaldehyd inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Zellen 10 Minuten mit 1 ml Permeabilisierungspuffer pro well unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit FCS (1% in PBS) blockiert. Nach Absaugen des Blotpuffers wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C mit 400 µl der Phalloidinlösung (1:200 in PBS verdünnt) inkubiert. Abschließend wurden die Zellen wiederum dreimal mit PBS gewaschen.

#### 2.6.2.2 Ermittlung der Zellgröße

Mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden unter Verwendung der 10er Optik pro Stimulation zehn zufällig ausgewählte Sichtfelder fotografiert und mit der Software

Scion Image morphometrisch ausgewertet. Das Programm berechnet dabei alle umschlossenen Flächen, die in einem bestimmten, vom Benutzer gewählten Farbbereich („Density Slice“) liegen und eine gewisse Mindestgröße, um Zellschrott auszuschließen, überschreiten (siehe Abbildung 5).

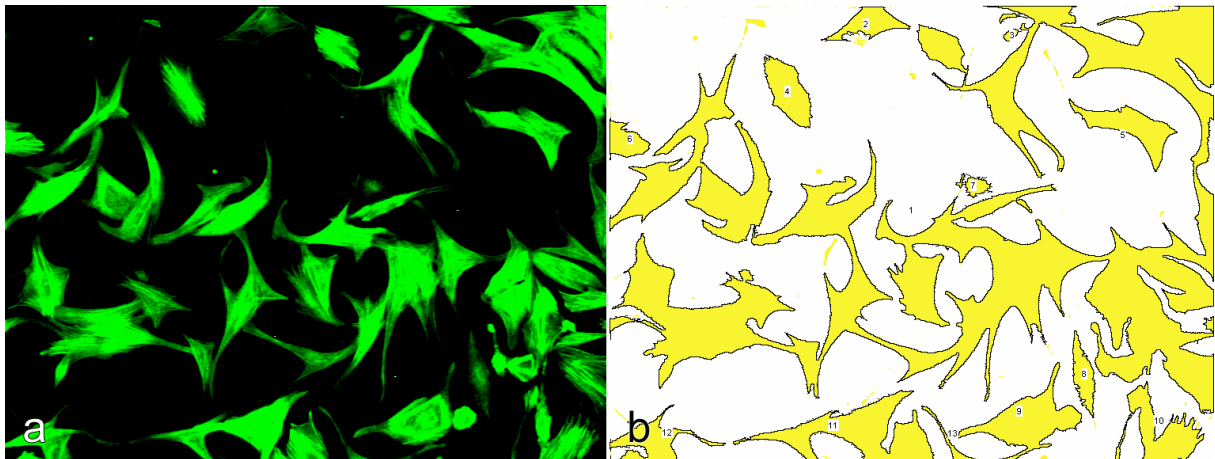


Abbildung 5: Mit FITC-konjugiertem Phalloidin gefärbte NRC (a) und mit Scion Image bestimmte Zellfläche (b).

## 2.7 Transiente Transfektionen mit Reportergenkonstrukten

### 2.7.1 Materialien

- FuGene 6 Transfection Reagent Roche
- Lipofectin GibcoBRL Life Technologies
- DOTAP Liposomales Transfektionsreagenz Roche
- SuperFect Qiagen

#### 2.7.1.1 Plasmide

- pEGFP-N<sub>3</sub> Clontech



- Ub<sup>G76V</sup>-GFP pEGFP-N<sub>3</sub> modifiziert nach Stack et al. 2000
- pGL2 NFκB mu2 luc  
NFκB-Bindungsstelle: 5'-TTC CCG GGA AAG AGG GGA CTT  
TCC GCT GGG ACT TTC CGA GCT AAG  
ATC TAG-3' ProMega
- pGL2 AP1 luc  
AP1-Bindungsstelle: 5'-TTC CCG GGA AAG AGT GAC TCA GCT  
TGA CTC AGA GCT AAG ATC TAG-3' ProMega
- pGL3 hBNP luc Konstrukt zur Verfügung gestellt von Dr. H. Bartsch (hBNP-Promoter nach Ogawa et al. 1995, pGL3 von ProMega)

### 2.7.2 Durchführung

Um die Kardiomyozyten effizient und schonend zu transfizieren, wurden liposomale Transfektionsreagenzien verwendet. Das dieser Methode zugrunde liegende Prinzip beruht auf der Ausbildung von Transfektionsreagenz-DNA-Komplexen, welche per Endozytose von den Zellen aufgenommen werden.

Da sich in der Literatur nur wenig Erfahrungen zum Einsatz von liposomalen Transfektionsreagenzien bei neonatalen Rattenkardiomyozyten fanden, wurden verschiedene Reagenzien unter wechselnden Bedingungen (siehe Tabelle 6) getestet. Transfiziert wurden die Zellen mit einem GFP-Konstrukt (pEGFP-N<sub>3</sub>, Clontech). Bei GFP handelt es sich um ein grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein), welches ursprünglich aus *Aequorea victoria*, einer im Pazifik vorkommenden Quallenart, extrahiert wurde. Das Protein besteht aus 238 Aminosäuren und hat sein Absorptionsmaximum bei 395 nm und sein Emissionsmaximum bei 508 nm. Zur Abschätzung der Transfektionseffizienz wurde nach 48 Stunden der Anteil der fluoreszierenden Zellen pro Sichtfeld bestimmt. Dabei wurden pro Versuch zehn zufällig ausgewählte Sichtfelder ausgezählt.

Die Protokolle der einzelnen Transfektionsreagenzien unterschieden sich nur geringfügig. Allen gemein war die erforderliche Dichte der Zellen von etwa 60-80%

Konfluenz, der Beginn der Transfektion 24 Stunden nach dem Ausplattieren und ein Inkubationsschritt bei Raumtemperatur nach Zusammenbringen von DNA und Reagenz. Dieser Schritt ist notwendig, um die Ausbildung der DNA-Reagenz-Komplexe zu ermöglichen.

Die Transfektionsprotokolle der einzelnen Substanzen lauten wie folgt:

### A) DOTAP

Die benötigte Menge DNA wurde in PBS zu einer Endkonzentration von 0,1 µg DNA/ µl verdünnt. Die eingesetzte Menge DOTAP wurde ad 100 µl in PBS gelöst. Beide Lösungen wurden zusammengebracht, vorsichtig durchmischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde nun zum serumfreien Medium hinzugegeben und die Zellen 6 Stunden inkubiert.

### B) SuperFect

Die eingesetzte Menge DNA wurde ad 100 µl in PBS verdünnt. Nach kurzem Anzentrifugieren wurde SuperFect hinzugegeben und die Mischung nach 10 Minuten Inkubation in 600 µl serumhaltigen Medium (10% NBGS) gelöst. Die Kardiomyozyten wurden nun drei Stunden mit dem fertigen Mix inkubiert.

### C) FuGene

Die verwendete Menge FuGene wurde ad 100 µl in PBS verdünnt. Anschließend wurde die DNA hinzugegeben und die Lösung vorsichtig durchmischt. Nach 15-minütiger Inkubation wurde das Gemisch tropfenweise zu den Zellen gegeben. Im Gegensatz zu allen anderen Transfektionsreagenzien gab es beim Einsatz von FuGene keine festen Inkubationszeiten, vielmehr konnten die FuGene-DNA-Komplexe für den gesamten Versuchszeitraum im Medium belassen werden.

### D) Lipofectin

DNA und Lipofectin wurden jeweils ad 100 µl in PBS verdünnt. Nach 45-minütiger

## Materialien und Methoden

Inkubation bei Raumtemperatur wurden beide Lösungen vereinigt, vorsichtig durchmischt und für weitere 15 Minuten inkubiert. Nach Hinzufügen von 800 µl serum- und antibiotikafreien Mediums wurde der DNA-Lipofectin-Mix zu den Zellen gegeben. Die anschließende Inkubation betrug 6 Stunden.

Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden die Zellen einmal mit 2 ml PBS pro well gewaschen (Ausnahme: FuGene) und mit 10% NBCS enthaltendem Medium behandelt. 48 Stunden nach Beginn der Transfektion wurde die Transfektionseffizienz wie oben bereits beschrieben bestimmt.

Tabelle 6: Effizienz der getesteten Transfektionsreagenzien

Reagenz	DNA-Menge [µg/ ml Medium]	Reagenzmenge [µl/ ml Medium]	Anteil fluoreszierender Zellen nach 48h [%]
DOTAP	1,25	10	10
	3	15	10
	4	20	10
SuperFect	2,9	14,3	1
	1,4	7,1	<1
FuGene	1	1,5	10
	0,5	3	12
	0,5	1,5	8
	1	5	10
	1	3	3
Lipofectin	1	5	3
	2	10	27
	2	20	3

Wie der Tabelle 6 zu entnehmen ist, erwies sich Lipofectin bei diesen Vorversuchen als das effizienteste Transfektionsreagenz, so dass alle weiteren Transfektionsexperimente mit dieser Substanz durchgeführt wurden. Dabei wurden jedoch in Abhängigkeit vom zu transfizierenden Plasmid einige Parameter des ursprüngli-

chen Protokolls verändert.

Die einzelnen, eingesetzten Plasmide werden im Folgenden beschrieben.

### A) Ub<sup>G76V</sup>-GFP

Bei diesem Plasmid handelt es sich um ein Konstrukt aus Ubiquitin und dem bereits beschriebenen GFP. Das Konstrukt ist dabei derart modifiziert, dass intrazelluläre Ubiquitin-Hydrolasen das Ubiquitin nicht vom GFP abspalten können. Daher wird das neusynthetisierte, ubiquitinierte GFP unmittelbar nach der Translation vom Proteasom abgebaut, so dass auch erfolgreich transfizierte Zellen im Fluoreszenzmikroskop nicht zu erkennen sind. Wird das Proteasom jedoch gehemmt, so akkumulieren Ubi-GFP-Proteine. Die Stärke der Fluoreszenz sowie die Anzahl der fluoreszierenden Zellen können nun als Maß für die Inhibition des Proteasoms genutzt werden.

Die Transfektion mit Ub<sup>G76V</sup>-GFP wurde 24 Stunden nach Ausplattieren begonnen. Nach Ende der 6-stündigen Inkubationsdauer wurden die Zellen 18 Stunden mit serumfreiem Medium behandelt und im Anschluss stimuliert. Nach weiteren 24 bzw. 48 Stunden wurde der Anteil der fluoreszierenden Zellen am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Dazu wurden 10 zufällig ausgewählte Sichtfelder (5er Optik) fotografiert.

### B) pGL2 AP1 luc

Bei diesem Plasmid sind die Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors AP1 (activating protein 1) und das Gen für das Enzym Luciferase miteinander verknüpft. AP1 gehört zur Gruppe der so genannten „immediate early genes“ und spielt eine Rolle in der Expressionsregulation von Zellzyklusregulatoren. Das Enzym Luciferase entstammt der südamerikanischen Feuerfliege, *Photinus pyralis*. Es katalysiert eine Reaktion mit einem Luciferin genannten Substrat, die unter Lichtemission erfolgt. Die Menge synthetisierter Luciferase ist proportional zur transkriptionellen Aktivität des Promoters und somit proportional zur RNA-Synthese der Gene, denen der gleiche Promoter vorgeschaltet ist.

Die Transfektion wurde 24 Stunden nach dem Ausplattieren gestartet; die Inkubationszeit mit pGL2 AP1 luc betrug 3 Stunden. Nach 21-stündiger Inkubation mit serumfreiem Medium wurden die Zellen stimuliert und nach 24 Stunden geerntet.

### C) pGL2 NF $\kappa$ B mu2 luc

Dieses Plasmid trägt zwei Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B) verbunden mit dem Luciferase-Gen.

Das Transfektionsprotokoll entsprach ebenfalls dem von pGL2 AP1 luc.

### D) pGL3 hBNP

Beim brain natriuretic peptide handelt es sich um ein Markergen der kardialen Hypertrophie.

Für die Transfektion mit diesem Plasmid wurden die Zellen 24 Stunden nach dem Ausplattieren für 24 Stunden serumfrei gesetzt. Nun folgte die Transfektion. Unmittelbar an die 3-stündige Inkubation schloss sich die Stimulation an. 24 Stunden nach Stimulationsbeginn wurden die Zellen geerntet.

## 2.8 Luciferase-Assays

### 2.8.1 Materialien

- Luminometer Lumat LB 9501 berthold
- Luciferase-Assay Kit (Reporter Lysis Buffer, Luciferase-Substrat) ProMega

### 2.8.2 Durchführung

Um die Luciferase-Synthese zu quantifizieren, wurden die Zellen nach dem Ende der Stimulation einmal mit 2 ml PBS pro well gewaschen und mit 250  $\mu$ l Reporter Lysis Buffer pro well lysiert. Nach Abschaben der Zellen und Überführen in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß wurde das Lysat 15 Sekunden gevortext, 15 Sekunden bei 12.000 x g (14.000 U/ min) zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml-

Eppendorfgefäß überführt.

Zur Messung der Luciferase-Aktivität wurden 100 µl Luciferase Assay Substrat und 20 µl des Zelllysats in ein Probenröhrchen pipettiert. Nach 5 Sekunden wurde für 10 Sekunden die Lichtemission mit dem Luminometer gemessen. Da das Substrat im Überschuss eingesetzt wurde, war die Menge des ausgesandten Lichts proportional zur Enzymmenge.

### 2.9 Messung der Aktivität des Proteasoms mit Hilfe fluorogener Substrate

#### 2.9.1 Materialien

- Fluorogenes Substrat Suc-LLVY-MCA (Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-4-Methyl-7-Coumarylamid, 2 mM) Bachem
- Methylcoumarylamid (MCA) Bachem
- Fluoreszenzmessgerät FL<sub>x</sub> 800 Biotek
- 96 well Platten, schwarz E & K scientific
- 3x 26S-Inkubationspuffer: 450 mM Tris HCl, pH 8,2  
90 mM KCl  
15 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>  
15 mM MgCl<sub>2</sub>
- Reaktionsansatz: 60 µl 3x 26S-Inkubationspuffer  
0,22 µl 0,5 M Dithiothreitol (DTT) Sigma  
6 µl 100 mM Adenosintriphosphat (ATP) Boehringer  
0,5 µl 1 M Phosphokreatin Calbiochem  
0,2 µl Phosphokreatinkinase (1 U/ µl) Sigma  
10 µl 2 mM Suc-LLVY-MCA  
23,3 µl H<sub>2</sub>O

### 2.9.2 Durchführung

Das Prinzip der hier angewendeten Methode zur Bestimmung der Aktivität des Proteasoms beruht auf der Eigenschaft bestimmter Substrate des Proteasoms, erst nach Abbau durch Proteasomen zu fluoreszieren. Gibt man nun diese so genannten fluorogenen Substrate im Überschuss zu isolierten Proteasomen bzw. Zelllysaten, so ist die messbare Fluoreszenz proportional zur Aktivität der Proteasomen.

Zur Isolation der Proteasomen wurden die Kardiomyozyten nach einer 48-stündigen Stimulation zweimal mit 2 ml PBS/ well gewaschen. Nach vollständigem Absaugen des PBS wurden die Zellen mit 80 µl Aqua bidest. überschichtet und abgeschabt. Zur vorsichtigen Lyse wurde die Zellsuspension dreimal in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und wieder aufgetaut. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 15.000 x g (14.000 U/ min) und 4°C wurde der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen.

Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Zur Messung wurden pro Probe 10 µg Protein ad 20 µl Aqua bidest. verdünnt und in eine schwarze 96 well-Platte pipettiert (Dreifachwerte). Nun wurde der frisch angesetzte Reaktionsansatz hinzugefügt, die Platte in Aluminiumfolie eingewickelt und nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C die Fluoreszenz bestimmt. Als Standards diente reines MCA (0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM und 3 µM); die Leerwerte wurden mit Aqua bidest. gemessen.

## 2.10 Synthesemessungen mittels Substratinkorporation

### 2.10.1 Materialien

- L-[3,4,5-<sup>3</sup>H(N)]-Leucin, 6,3 TBq/ mmol = 170 Ci/ mmol, 1 µCi/ µl Perkin Elmer Life Sciences
- [5,6-<sup>3</sup>H]-Uridin, 1,6 TBq/ mmol = 44,5 Ci/ mmol, 1 µCi/ µl Perkin Elmer Life Sciences
- α-Amanitin Sigma

- rotiszint eco plus Carl Roth GmbH & Co.
- Trichloressigsäure (TCA, 20% und 5% in H<sub>2</sub>O) Sigma
- Szintillationscounter Wallac 1409 PerkinElmer Life Sciences

### 2.10.2 Durchführung

Die durchgeführten Inkorporationsversuche dienten der Analyse der Protein- bzw. RNA-Synthese der Kardiomyozyten. Zur Messung der Proteinsynthese wurden dem Medium für die letzten drei Stunden einer Stimulation 5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  der mit Tritium radioaktiv markierten Aminosäure Leucin zugesetzt. Analog dazu wurden zur Quantifizierung der RNA-Synthese die NRC in den letzten drei Stunden einer Stimulation mit 5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  des radioaktiv markierten Nukleosids Uridin inkubiert. Je nach Syntheseleistung wurde nun mehr oder weniger des angebotenen Substrats von den Zellen zum Aufbau von Proteinen bzw. RNA verwendet. Zur Messung der inkorporierten Nuklide wurden die Zellen nach Beendigung der Stimulation einmal mit 2 ml PBS pro well gewaschen und mit 200  $\mu\text{l}$  RIPA pro well 15 Minuten auf Eis lysiert. Nach Abschaben und Überführen in 2 ml-Zentrifugenröhrchen wurden 250  $\mu\text{l}$  eiskalte 20% TCA zum Lysat gegeben. Anschließend wurde das Lysat weitere 15 min auf Eis stehen gelassen und für 20 min bei 12.000 x g (14.000 U/ min) zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250  $\mu\text{l}$  5% TCA resuspendiert. Es folgte ein weiterer 20-minütiger Zentrifugenschritt bei 12.000 x g (14.000 U/ min). Nach Abnahme des Überstands wurde das entstandene Pellet in 250  $\mu\text{l}$  0,2 N NaOH resuspendiert und 2 Minuten bei 50°C im Thermomixer geschüttelt. Nun wurden 1,4 ml des Szintillationscocktails hinzugefügt. Die Hüllelektronen der im Cocktail enthaltenen Moleküle werden durch die  $\beta^-$ -Strahlung des Tritium angeregt und fallen nach  $10^{-8}$  Sekunden unter Lichtemission auf ihren ursprünglichen Zustand zurück. Dies wurde für 60 Sekunden im Szintillationscounter gemessen.

Um bei der RNA-Synthese eine Unterscheidung zwischen mRNA- und rRNA-Synthese zu ermöglichen, inhibierten wir die DNA-abhängige RNA-Polymerase II, die für die Synthese der mRNA verantwortlich ist, mit 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\alpha$ -Amanitin.



### 2.11 Statistische Auswertung

Die ermittelten Daten wurden mit der Software SigmaStat (Version 2.0, Jandel Corporation © 1992-1995) auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Dazu wurden einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) und  $t$ -Tests durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

Um einen möglichen antihypertrophen Effekt der Proteasominhibitoren zu zeigen, wurden die Kennzeichen einer Hypertrophie kardialer Myozyten, d. h. Flächenzunahme, Erhöhung des Gehalts bestimmter Markerproteine, Veränderung der Genexpression und gesteigerte RNA- und Proteinsynthese untersucht.

Dabei konnte durch morphometrische Analysen der Zellfläche die dosisabhängige Verminderung des Zellwachstums bei Inkubation mit Proteasominhibitoren gezeigt werden. Weiterhin gelang es durch Western Blot Analysen, die dosisabhängige Abnahme der Hypertrophiemarkerproteine  $\beta$ -myosin heavy chain,  $\alpha$ -sarcomeric actin und  $\alpha$ -smooth muscle actin nach Behandlung mit Proteasominhibitoren nachzuweisen. Die verminderte Expression des Markergens BNP konnte durch Transfektion mit einem Reportergenkonstrukt dokumentiert werden. Schließlich konnte durch die verminderte Inkorporation radioaktiv markierter Substrate nach 24-stündiger Inkubation mit Proteasominhibitoren eine deutlich verringerte RNA- und Proteinsynthese belegt werden. Darüber hinaus zeigte sich nach Hemmung der mRNA-Synthese eine Abnahme der rRNA-Synthese.

Die effiziente Blockierung des Proteasoms wurde durch Quantifizierung polyubiquitiner Proteine mittels Western Blots, durch Messung der Fluoreszenz nach Transfektion mit Ub<sup>G76V</sup>-GFP und durch Bestimmung der proteasomalen Aktivität mittels fluorogener Substrate dokumentiert.

Zur Aufdeckung der Mechanismen, die dem antihypertrophen Effekt der Hemmung des Proteasoms zugrunde liegen, wurde zunächst die Aktivierbarkeit der zur Familie der mitogen activated protein kinases (MAPK) gehörenden extracellular signal regulated kinases 1/2 (ERK 1/2, auch MAPK p44/42) mit Western Blot Analysen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivierbarkeit dieser für die Signaltransduktion in der Entstehung von Hypertrophie eminent wichtigen Enzyme durch Proteasominhibitoren drastisch reduziert wird.

Des Weiteren zeigten Versuche mit Reportergenkonstrukten eine reduzierte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B. Demgegenüber bewirkte die Hemmung des Proteasoms eine verstärkte Aktivität des Transkriptionsfaktors AP1.

### 3.1 Untersuchung der Kennzeichen der Hypertrophie

#### 3.1.1 Morphometrische Auswertung der Zellfläche

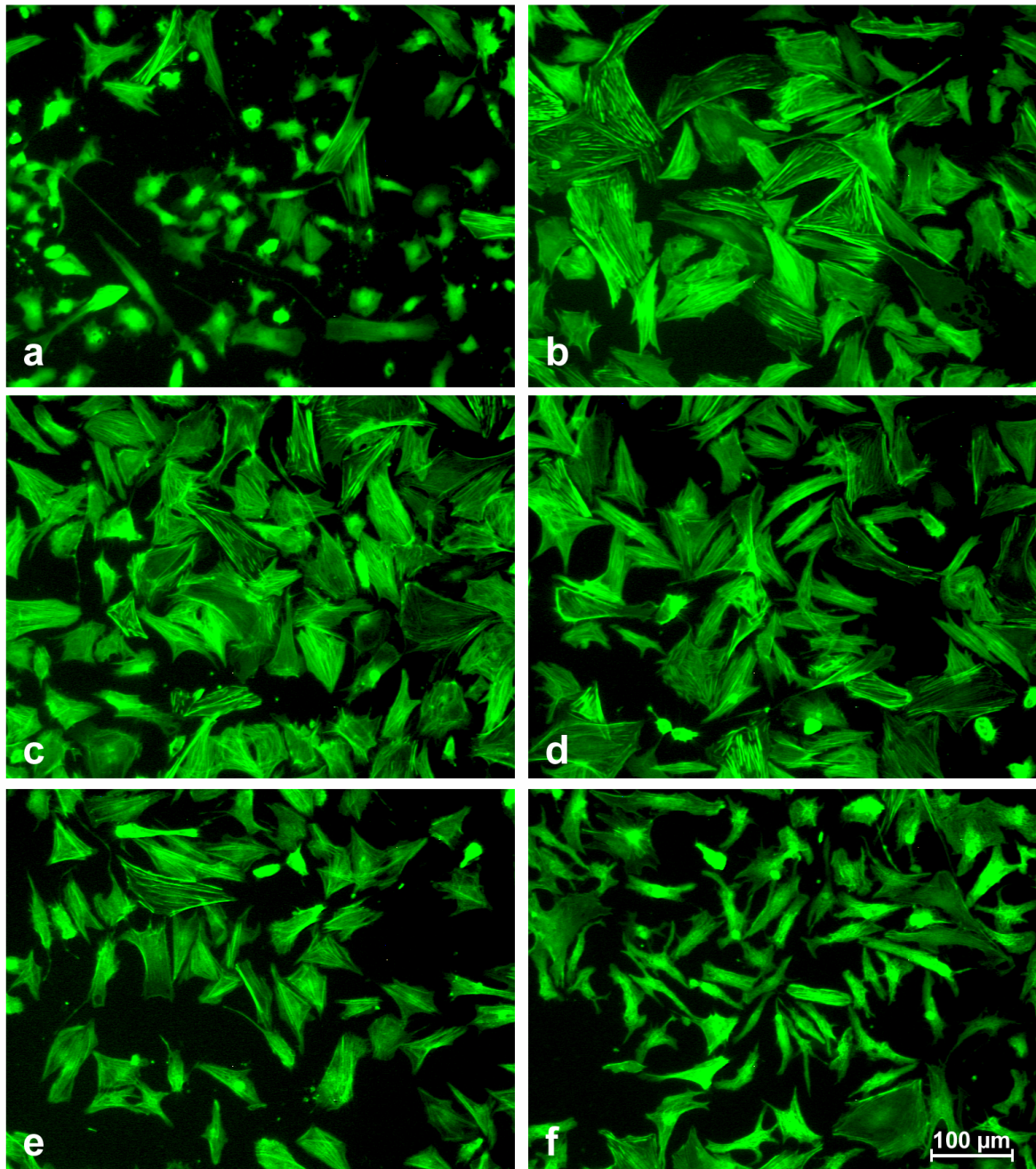


Abbildung 6: Mit 10% FCS und verschiedenen Inhibitoren über 48 Stunden behandelte und mit Phalloidin-FITC gefärbte NRC. a: Kontrolle, b-f: 10% FCS, c: 1 µM ALLM, d: 0,1 µM MG262, e: 1 µM MG262, f: 1 µM MG132.

Zur Quantifizierung der beobachteten Wachstumsverringering der Kardiomyozyten nach Inkubation mit Proteasominhibitoren wurden Phalloidin-gefärbte NRC mittels Morphometrie analysiert (Abbildung 6).

Dazu wurden neonatale Rattenkardiomyozyten für 48 Stunden mit 10% FCS allein und kombiniert mit verschiedenen Inhibitoren behandelt. Um die Spezifität des beobachteten Effekts zu überprüfen, verwendeten wir zwei Proteasominhibitoren, MG132 und MG262, und einen Inhibitor zytoplasmatischer Proteasen (ALLM). Ausschließlich mit FCS inkubierte Zellen zeigten hierbei gegenüber den unbehandelten Kontrollen einen Flächenzuwachs von 112% ( $p < 0,001$ ), welcher durch Zugabe von Proteasominhibitoren dosisabhängig verringert werden konnte. So reduzierte sich die durchschnittliche Zellfläche im Vergleich zu ausschließlich mit FCS behandelten Zellen durch Zugabe von MG262 um 16% (0,1  $\mu\text{M}$ ,  $p = 0,015$ ) bzw. um 43% (1  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0,001$ ). Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  MG132 führte zu einer Flächenreduktion um 41% ( $p < 0,001$ ). Der Einsatz von 1  $\mu\text{M}$  ALLM zeigte dagegen keinen signifikanten Effekt auf die Zellfläche ( $p = 0,170$ ) (Abbildung 7).

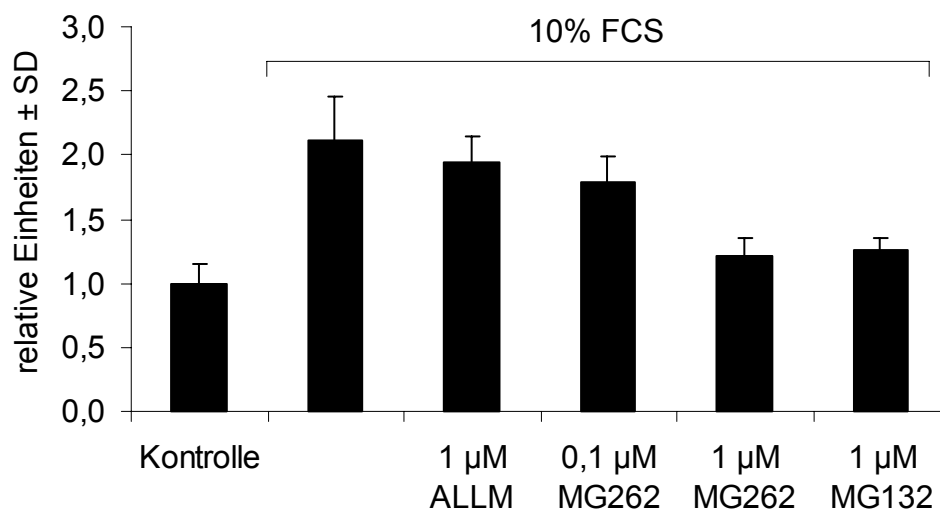


Abbildung 7: Veränderung der Zellfläche nach Behandlung mit 10% FCS allein und kombiniert mit ALLM, MG132 oder MG262. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 10$ ) genormt auf die Kontrolle.

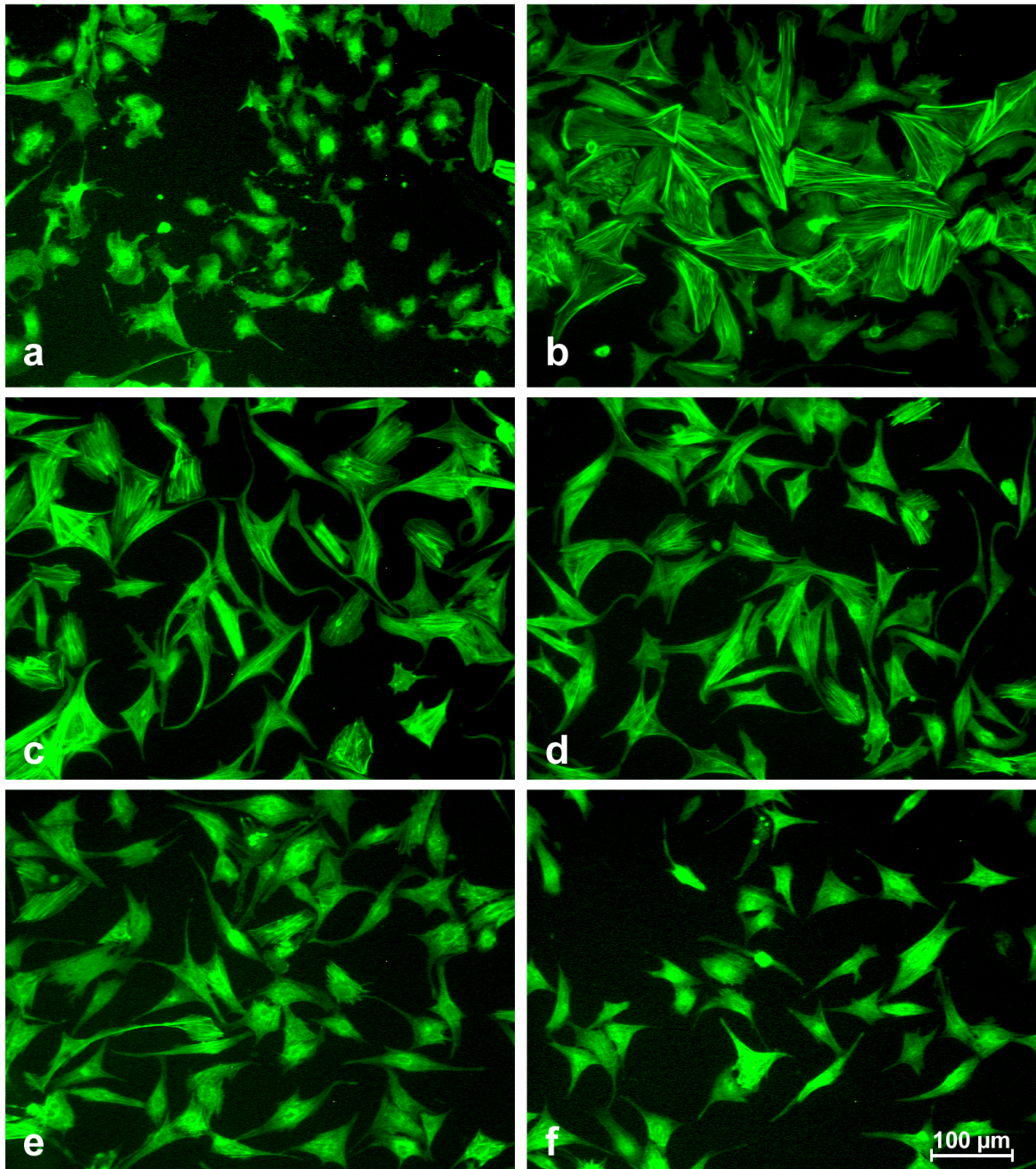


Abbildung 8: Mit 10 µM Isoproterenol und 0,05-1 µM MG132 über 48 Stunden behandelte und mit Phalloidin-FITC gefärbte NRC. a: Kontrolle, b-f: 10 µM Isoproterenol, c: 0,05 µM MG132, d: 0,1 µM MG132, e: 0,5 µM MG132, f: 1 µM MG132.

Im folgenden wurde der dosisabhängige Effekt des Proteasominhibitors MG132 auf mit Isoproterenol induzierter Hypertrophie untersucht. Dazu wurden die Zellen 48 Stunden mit 10 µM Isoproterenol allein und zusammen mit 50 nM, 100 nM, 0,5

$\mu\text{M}$  bzw.  $1 \mu\text{M}$  MG132 behandelt (Abbildung 8).

Dabei zeigte sich analog zur mit Serum induzierten Hypertrophie eine Flächenzunahme der mit Isoproterenol stimulierten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen um 91% ( $p < 0,001$ ). Diese Zunahme fiel bei Kombination mit MG132 deutlich geringer aus. So resultierte bereits die Zugabe von  $50 \text{ nM}$  MG132 in einer um 30% ( $p < 0,001$ ) verminderten Zellfläche (Abbildung 9).  $100 \text{ nM}$  MG132 bewirkten eine Reduktion um 36% ( $p < 0,001$ ),  $0,5 \mu\text{M}$  um 44% ( $p < 0,001$ ) und  $1 \mu\text{M}$  MG132 um 56% ( $p < 0,001$ ).

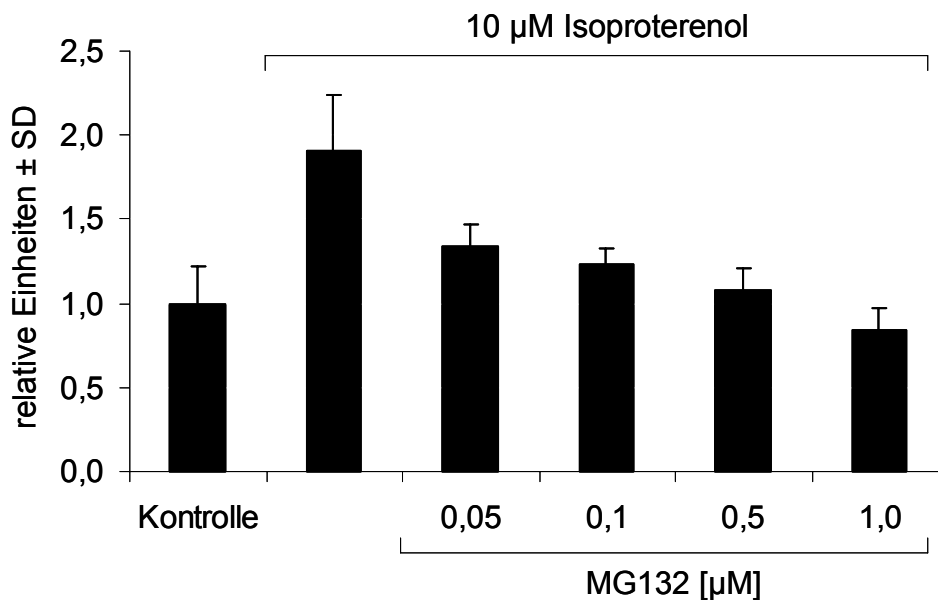


Abbildung 9: Veränderung der Zellfläche nach Behandlung mit  $10 \mu\text{M}$  Isoproterenol allein und kombiniert mit  $0,05$ - $1 \mu\text{M}$  MG132. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 10$ ) genormt auf die Kontrolle.

Zum Vergleich mit dem  $\beta$ -Sympathomimetikum Isoproterenol wurde in einer weiteren Versuchsreihe der Einfluss von MG132 auf die Induzierbarkeit von Hypertrophie mit Angiotensin II untersucht (Abbildung 10).



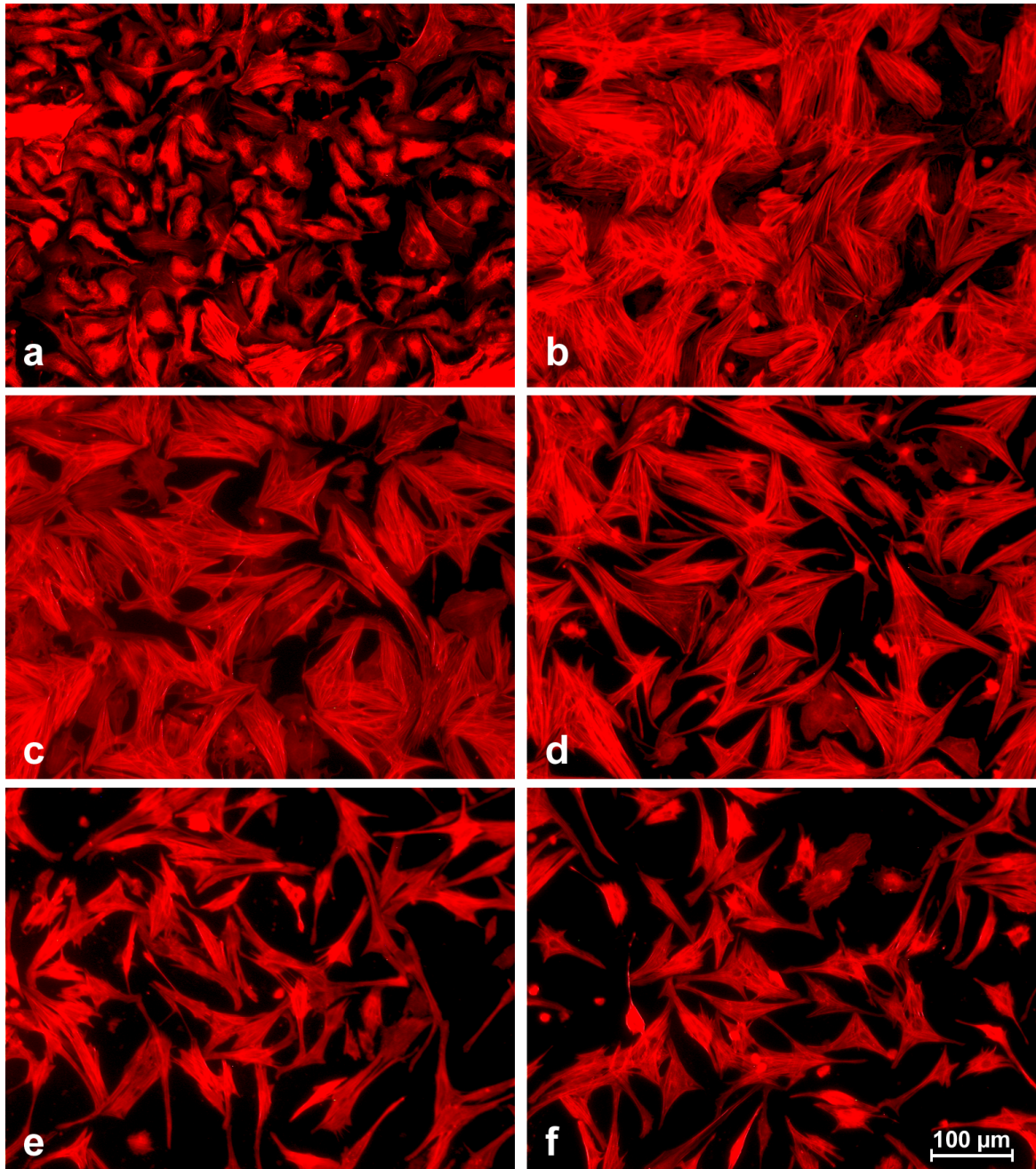


Abbildung 10: Mit 20  $\mu\text{M}$  Angiotensin II und 0,05-1  $\mu\text{M}$  MG132 über 48 Stunden behandelte und mit Phalloidin-TRITC gefärbte NRC. a: Kontrolle, b-f: 20  $\mu\text{M}$  Angiotensin II, c: 0,05  $\mu\text{M}$  MG132, d: 0,1  $\mu\text{M}$  MG132, e: 0,5  $\mu\text{M}$  MG132, f: 1  $\mu\text{M}$  MG132.

Dabei wurden 20  $\mu\text{M}$  Angiotensin II und 0,05-1  $\mu\text{M}$  MG132 über 48 Stunden eingesetzt. Ermittelt wurde eine Vergrößerung der durchschnittlichen Zellfläche der

mit 20  $\mu\text{M}$  Angiotensin II stimulierten NRC im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen um 147% ( $p < 0,001$ ). Verglichen mit den ausschließlich mit Angiotensin II inkubierten Zellen zeigten die zusätzlich mit MG132 behandelten Zellen wiederum ein dosisabhängig vermindertes Wachstum. 50 nM MG132 führten zu einer Verringerung der Zellfläche um 31% ( $p < 0,001$ ). Bei 100 nM waren es 44% ( $p < 0,001$ ), bei 0,5  $\mu\text{M}$  51% ( $p < 0,001$ ) und bei 1  $\mu\text{M}$  54% ( $p < 0,001$ ). Abbildung 11 zeigt den Effekt von MG132 auf die Zellfläche in relativen Einheiten normiert auf die Kontrolle.

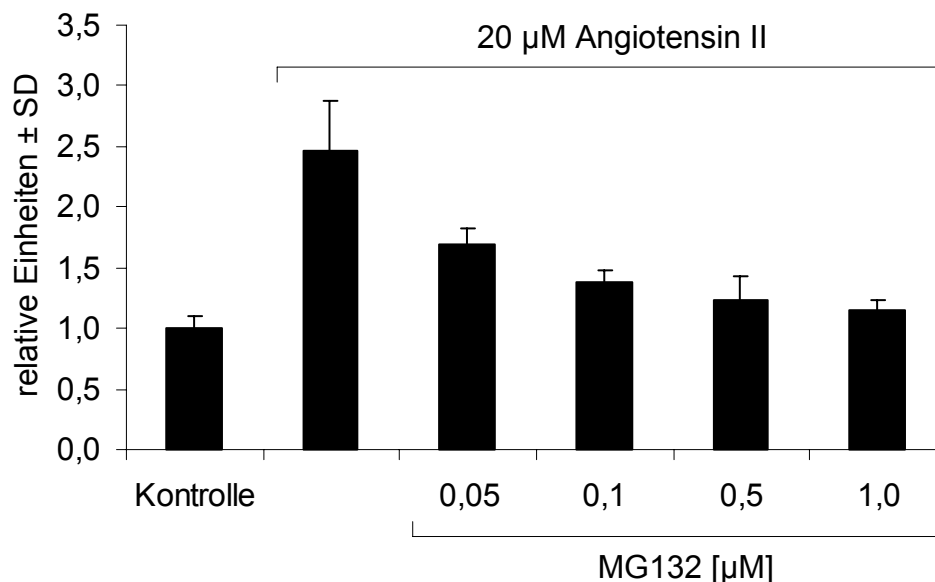


Abbildung 11: Veränderung der Zellfläche nach Behandlung mit 20  $\mu\text{M}$  Angiotensin II allein und kombiniert mit 0,05-1  $\mu\text{M}$  MG132. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 10$ ) genormt auf die Kontrolle.

### 3.1.2 Nachweis von Hypertrophiemarkerproteinen

Um zu untersuchen, ob sich die Inhibition des Proteasoms auch auf die Menge ausgewählter Hypertrophiemarkerproteine auswirkt, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Dazu wurden die NRC für 48 Stunden mit 10  $\mu\text{M}$  Isoproterenol allein und kombiniert mit 0,05-1  $\mu\text{M}$  MG132 behandelt.



Abbildung 12 zeigt die densitometrisch ausgewerteten Ergebnisse für  $\beta$ -myosin heavy chain ( $\beta$ MHC). Isoproterenol bewirkte hier eine deutliche Zunahme des Proteins im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Diese Erhöhung des Proteingehalts konnte durch gleichzeitige Behandlung mit MG132 dosisabhängig und reproduzierbar verringert werden. Wie aus Abbildung 12 ersichtlich lag die Menge an  $\beta$ MHC bereits bei Koinkubation mit 0,5  $\mu$ M MG132 unter der der Kontrolle.

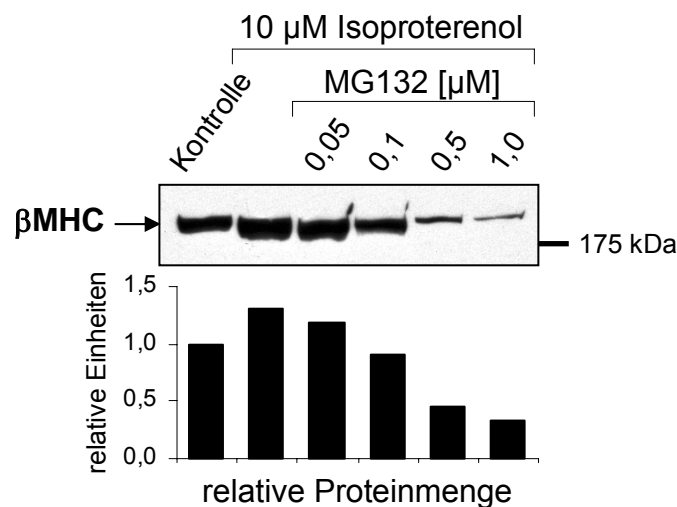


Abbildung 12: Veränderung der Proteinmenge von  $\beta$ MHC nach 48-stündiger Stimulation mit 10  $\mu$ M Isoproterenol allein und kombiniert mit 0,05-1  $\mu$ M MG132. Das Diagramm zeigt die relative Proteinmenge genormt auf die Kontrolle nach Densitometrie.

Abbildung 13 stellt die Daten der Untersuchung von  $\alpha$ -sarcomeric actin ( $\alpha$ SA) dar. Hier erreichte Isoproterenol eine massive Erhöhung der Menge an  $\alpha$ SA im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Diese starke Zunahme konnte durch Inkubation mit niedrig konzentriertem MG132 nicht verringert werden. Die Verwendung höherer Konzentrationen von MG132 resultierte jedoch wieder in einer dosisabhängigen Reduktion der Proteinmenge.

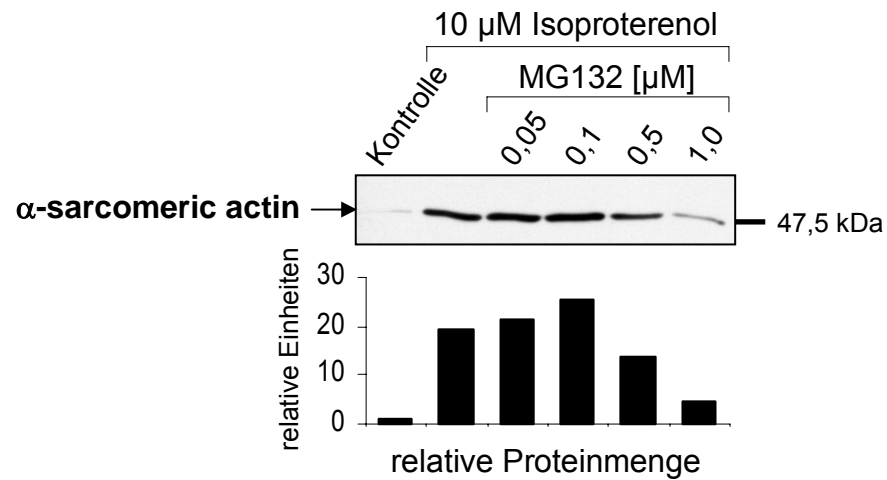


Abbildung 13: Veränderung der Proteinmenge von  $\alpha$ -sarcomeric actin nach 48-stündiger Stimulation mit 10  $\mu$ M Isoproterenol allein und kombiniert mit 0,05-1  $\mu$ M MG132. Das Diagramm zeigt die relative Proteinmenge genormt auf die Kontrolle nach Densitometrie.

Als letztes wurde die Wirkung von Isoproterenol und MG132 auf  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -Aktin des glatten Muskels,  $\alpha$ SMA) untersucht. Dabei konnte keine Zunahme des Proteins durch Behandlung mit Isoproterenol gezeigt werden. Jedoch nahm auch hier die Menge von  $\alpha$ SMA durch Inhibition des Proteasoms dosisabhängig ab (Abbildung 14).

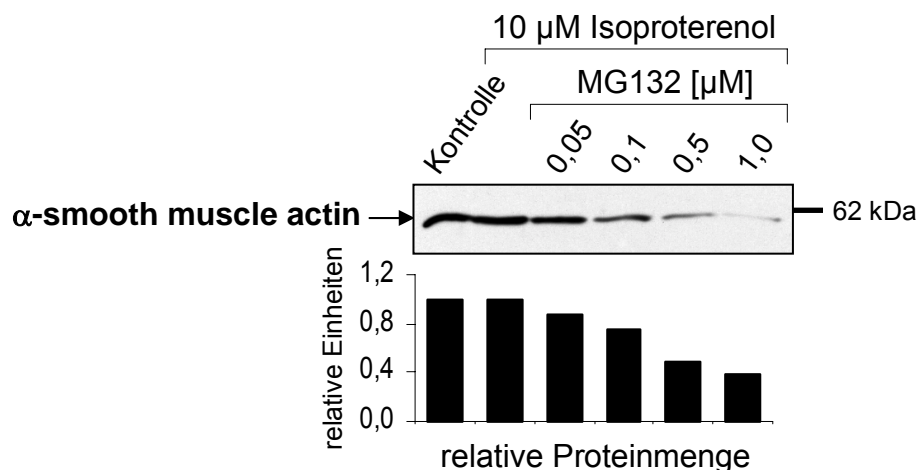


Abbildung 14: Veränderung der Proteinmenge von  $\alpha$ -smooth muscle actin nach 48-stündiger Stimulation mit 10  $\mu$ M Isoproterenol allein und kombiniert mit 0,05-1  $\mu$ M MG132. Das Diagramm zeigt die relative Proteinmenge genormt auf die Kontrolle nach Densitometrie.

### 3.1.3 BNP-Expressionsanalyse

Das brain natriuretic peptide (BNP) gilt als Hypertrophiemarker. Bereits kurze Zeit nach Behandlung mit Hypertrophie-induzierenden Stimuli zeigt sich ein starker Anstieg der Expression. Daher wurde mit einem Luciferase-Reportergenkonstrukt (pGL3 BNP luc) die Expression von BNP (brain natriuretic peptide) nach Stimulation mit 50  $\mu$ M Isoproterenol untersucht. Dabei zeigte sich nach 24 Stunden ein Anstieg der Expression um Faktor 10,5 ( $p < 0,001$ ). Wurden die Zellen zusätzlich zum Isoproterenol mit 1  $\mu$ M MG132 behandelt, nahm die Expression im Vergleich zu ausschließlich mit Isoproterenol inkubierten Zellen um 44% ( $p = 0,003$ ) ab (Abbildung 15).

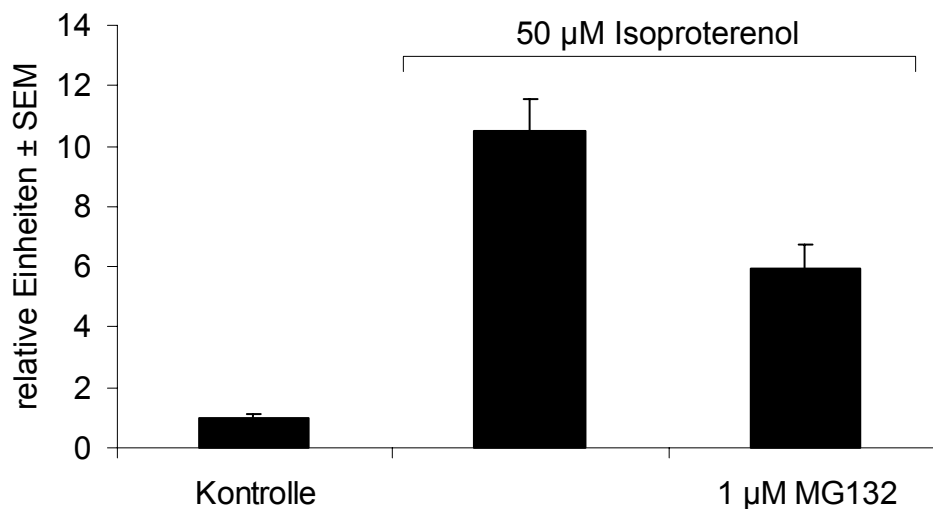


Abbildung 15: Expression von BNP nach 24-stündiger Behandlung mit 50 µM Isoproterenol allein und kombiniert mit 1 µM MG132. Das Diagramm zeigt Mittelwerte ± SEM (n = 12) genormt auf die Kontrolle.

#### 3.1.4 Messung der Proteinsynthese

Zur Klärung der Frage, welchen Einfluss die Proteasominhibition auf die Hypertrophie-vermittelte Proteinsynthese hat, wurde die Veränderung der Proteinsynthese mittels Inkorporation der mit Tritium radioaktiv markierten Aminosäure Leucin in den letzten 4 Stunden einer Stimulation mit hypertrophen Agonisten wie FCS und Isoproterenol gemessen.

Zunächst wurden NRC für 24 Stunden mit 10% FCS allein und kombiniert mit ALLM, MG132 oder MG262 inkubiert. Dabei zeigte sich ein Anstieg der Proteinsynthese bei den ausschließlich mit FCS stimulierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten NRC um 225% ( $p = 0,01$ ). Wurden die Zellen gleichzeitig mit 1 µM MG132 behandelt, war die Syntheseleistung im Vergleich zur Stimulation mit FCS allein um 43% ( $p = 0,048$ ) geringer. 1 µM MG262 bewirkte eine um 81% ( $p = 0,005$ ) verringerte Synthese. Dagegen zeigte sich bei Zugabe von 1 µM ALLM keine signifikante Veränderung ( $p = 0,307$ ) der Syntheseleistung im Vergleich zu ausschließlich mit FCS behandelten Zellen (Abbildung 16).

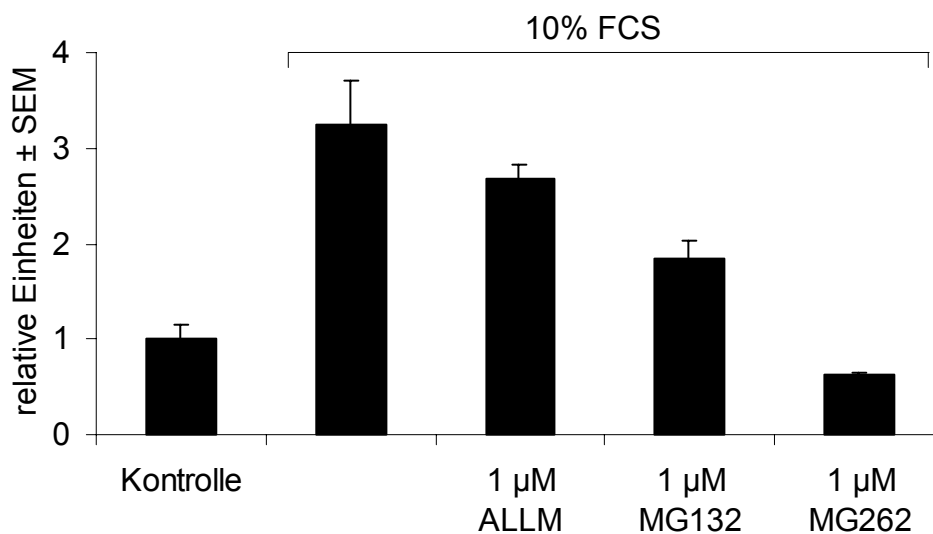


Abbildung 16: Veränderung der Proteinsynthese nach 24-stündiger Inkubation mit 10% FCS und ALLM, MG132 bzw. MG262. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) genormt auf die Kontrolle.

Bei dem in Abbildung 17a dargestellten Versuch wurden NRC erneut über 24 Stunden mit FCS-haltigem Medium und 0,05-1  $\mu$ M MG132 inkubiert. Es konnte eine Zunahme der Synthese durch Behandlung mit 10% FCS um Faktor 4,5 ( $p < 0,001$ ) gezeigt werden. Zugabe von 0,05  $\mu$ M bzw. 0,1  $\mu$ M MG132 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Syntheseleistung im Vergleich zu ausschließlich mit FCS inkubierten NRC ( $p = 0,252$  bzw.  $p = 0,403$ ). Dagegen resultierten Dosen von 0,5  $\mu$ M bzw. 1  $\mu$ M MG132 in einer Verringerung der Synthese um 56% ( $p = 0,001$ ) bzw. 61% ( $p < 0,001$ ).

Des Weiteren wurde die Wirkung von Isoproterenol untersucht. NRC wurden dazu mit 100  $\mu$ M Isoproterenol und 0,05-1  $\mu$ M MG132 inkubiert. Wie Abbildung 17b zeigt, nahm dabei die Proteinsynthese im Vergleich zu unstimulierten Zellen um 62% ( $p < 0,001$ ) zu. Wurden die Zellen jedoch zusätzlich mit 0,05  $\mu$ M MG132 inkubiert, verringerte sich die Synthese im Vergleich zu ausschließlich mit Isoproterenol inkubierten NRC um 57% ( $p < 0,001$ ). Mit 0,1  $\mu$ M MG132 fiel die Synthese um 59% ( $p < 0,001$ ) geringer aus. 0,5  $\mu$ M bzw. 1  $\mu$ M MG132 resultierten in einer Verminderung um 60% ( $p < 0,001$ ) bzw. 69% ( $p < 0,001$ ).

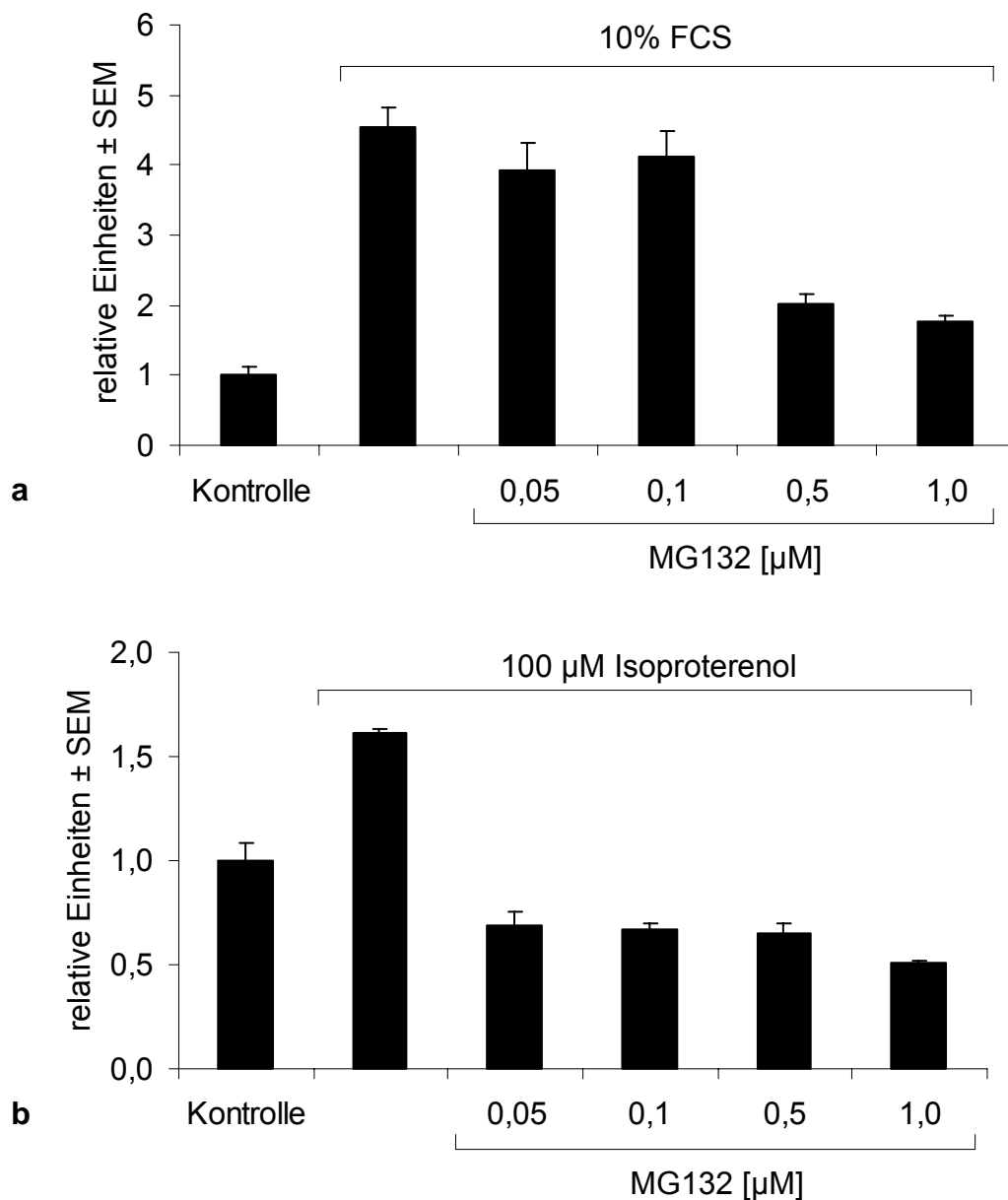


Abbildung 17: Veränderung der Proteinsynthese nach 24-stündiger Inkubation mit 10% FCS (a) bzw. 100  $\mu$ M Isoproterenol (b) und 0,05-1  $\mu$ M MG132. Die Diagramme zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 3) genormt auf die Kontrolle.

### 3.1.5 Messung der RNA-Synthese

Analog zur Untersuchung der Proteinsynthese wurde der Einfluss der Proteasom-inhibitoren auf die RNA-Synthese mittels Inkorporation des mit Tritium radioaktiv

markierten Nukleosids Uridin gemessen.

Wie aus Abbildung 18 ersichtlich führte eine 24-stündige Inkubation mit FCS-haltigem Medium zu einer Steigerung der RNA-Synthese um Faktor 4 ( $p < 0,001$ ). Die gleichzeitige Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  MG132 reduzierte die Synthese im Vergleich zu mit FCS behandelten Zellen um 33% ( $p < 0,001$ ). Durch 1  $\mu\text{M}$  MG262 sank die Syntheseleistung um 84% ( $p < 0,001$ ). Demgegenüber hatte 1  $\mu\text{M}$  ALLM keinen signifikanten Effekt ( $p = 0,111$ ).

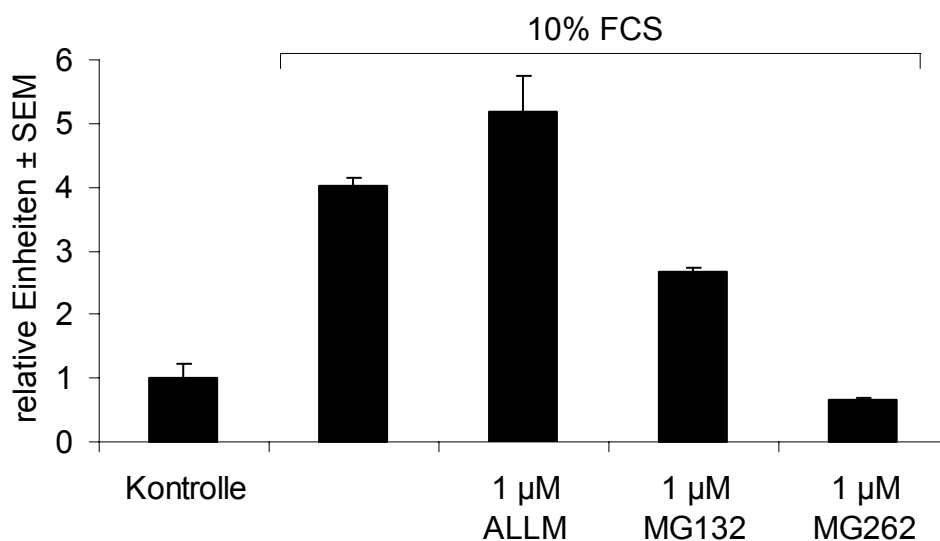


Abbildung 18: Veränderung der RNA-Synthese nach 24-stündiger Inkubation mit 10% FCS und ALLM, MG132 bzw. MG262. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) genormt auf die Kontrolle.

In Abbildung 19a finden sich die Ergebnisse einer 24-stündigen Stimulation mit FCS-haltigem Medium und 0,05-1  $\mu\text{M}$  MG132. 10% FCS steigerten die Syntheserate um 152% ( $p = 0,01$ ). Zugabe von 0,05  $\mu\text{M}$  oder 0,1  $\mu\text{M}$  MG132 zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Wirkung des FCS ( $p = 0,249$  bzw.  $p = 0,452$ ). Dagegen verminderten höhere Konzentrationen von MG132 den synthesessteigernden Effekt des FCS. So war die Syntheseleistung im Vergleich zu mit FCS allein behandelten Zellen bei 0,5  $\mu\text{M}$  MG132 um 43% ( $p = 0,028$ ) und bei 1  $\mu\text{M}$  MG132 um

59% ( $p = 0,007$ ) geringer.

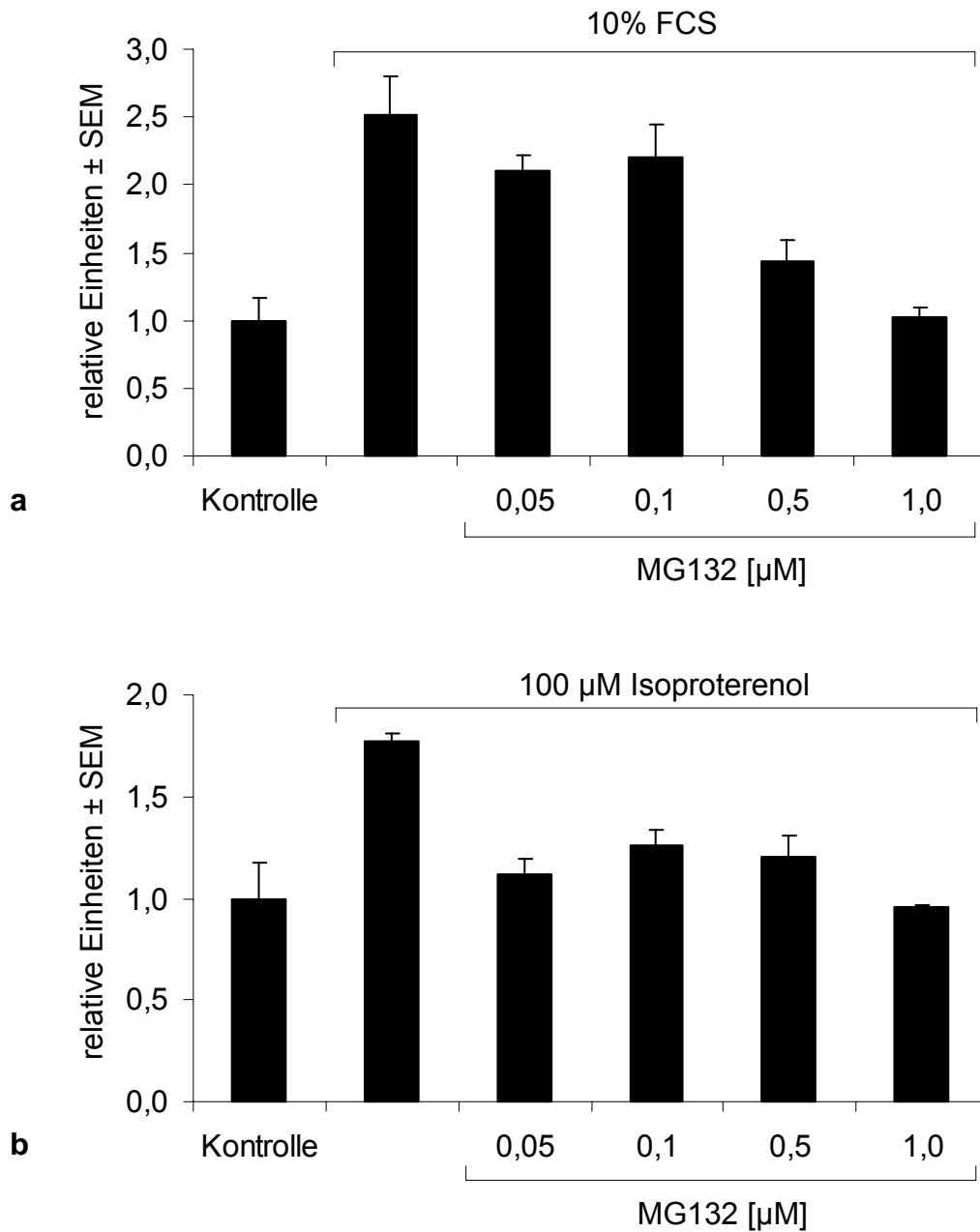


Abbildung 19: Veränderung der RNA-Synthese nach 24-stündiger Inkubation mit 10% FCS (a) bzw. 100  $\mu$ M Isoproterenol (b) und 0,05-1  $\mu$ M MG132. Die Diagramme zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) genormt auf die Kontrolle.



Eine Stimulation über 24 Stunden mit 100  $\mu\text{M}$  Isoproterenol allein und kombiniert mit 0,05-1  $\mu\text{M}$  MG132 gibt die Abbildung 19b wider. Dabei nahm die RNA-Synthese nach Stimulation mit Isoproterenol im Vergleich zu unbehandelten NRC um 77% ( $p = 0,013$ ) zu. Koinkubation mit 0,05  $\mu\text{M}$  MG132 resultierte in einer Verringerung der Synthese im Vergleich zur Isoproterenol-Gruppe um 37% ( $p = 0,001$ ). 0,1  $\mu\text{M}$  MG132 bewirkte eine Reduktion um 29% ( $p = 0,003$ ). Durch 0,5  $\mu\text{M}$  bzw. 1  $\mu\text{M}$  MG132 ließ sich die Syntheserate um 32% ( $p = 0,007$ ) bzw. 46% ( $p < 0,001$ ) reduzieren.

### 3.1.6 Messung der rRNA-Synthese

Die in Abschnitt 3.1.5 beschriebene RNA-Synthese gibt die Veränderungen der Gesamt-RNA-Synthese wider. Diese setzt sich aus ribosomaler, messenger und transfer RNA-Synthese zusammen, wobei die einzelnen RNA-Subtypen von verschiedenen Unterformen der DNA-abhängigen RNA-Polymerase synthetisiert werden. Um nun zwischen ribosomaler und messenger-RNA-Synthese unterscheiden zu können, inhibierten wir die für die mRNA-Synthese zuständige DNA-abhängige RNA-Polymerase II in einem weiteren Experiment mit 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\alpha$ -Amanitin. Dabei zeigte sich – analog zu den oben beschriebenen Daten – ein Anstieg der RNA-Syntheserate um Faktor 5,1 ( $p = 0,024$ ) nach 24-stündiger Inkubation mit 10% FCS im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Gleichzeitige Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  MG132 verringerte die Rate im Vergleich zu ausschließlich mit FCS behandelten Zellen um 74% ( $p = 0,002$ ). Wurden Zellen ausschließlich mit  $\alpha$ -Amanitin behandelt, reduzierte sich die Syntheserate im Vergleich zu den Kontrollzellen um 46% ( $p = 0,01$ ). Gleichzeitige Behandlung mit FCS und  $\alpha$ -Amanitin führte zu einer 39% ( $p = 0,029$ ) geringeren Syntheserate im Vergleich zu mit FCS allein inkubierten Zellen. Bei Zellen, die mit FCS,  $\alpha$ -Amanitin und MG132 behandelt wurden, wurde eine um 49% ( $p < 0,001$ ) verringerte Synthese im Vergleich zu mit FCS und  $\alpha$ -Amanitin behandelten Zellen gemessen. Dieser Wert lag 69% ( $p = 0,003$ ) unter dem bei ausschließlich mit FCS behandelten Zellen ermittelten Wert und unterschied sich somit nicht signifikant ( $p = 0,4$ ) von Messungen bei Zellen, die mit FCS und MG132 allein behandelt wurden (Abbildung 20).

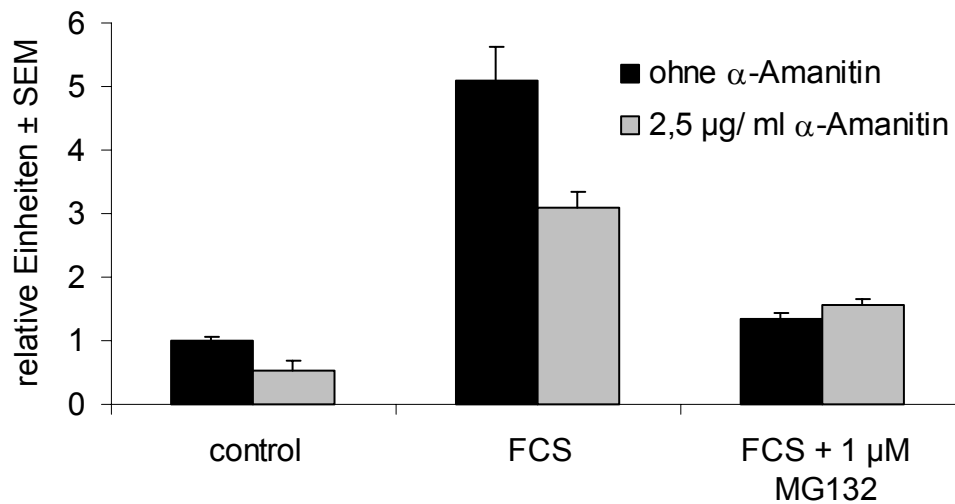


Abbildung 20: Veränderung der ribosomalen RNA-Synthese nach 24-stündiger Inkubation mit 10% FCS, 1  $\mu\text{M}$  MG132 und 2,5  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Amanitin. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) genormt auf die Kontrolle.

### 3.2 Nachweis und Quantifizierung der Inhibition des Proteasoms

#### 3.2.1 Akkumulation polyubiquitinerter Proteine

Um die effiziente, dosisabhängige Inhibition des Proteasoms zu zeigen, wurde mittels Western Blot Analysen die Anhäufung polyubiquitinerter Proteine nachgewiesen. Dazu wurden NRC mit 10  $\mu\text{M}$  Isoproterenol und 0,05-1  $\mu\text{M}$  MG132 stimuliert und nach 12, 24, 48 und 72 Stunden geerntet. Abbildung 21 gibt hierzu repräsentative Western Blots wider.

Während alleinige Stimulation mit Isoproterenol unabhängig von der Inkubationsdauer die Menge polyubiquitinerter Proteine unbeeinflusst ließ, führte bereits eine 12-stündige Inkubation mit niedrig dosiertem MG132 zu einer deutlichen Zunahme des Gehalts an Ubiquitinkonjugaten um bis zu Faktor 25 im Vergleich zur Kontrolle. Während die Wirkung von 100 nM über den Zeitverlauf nahezu konstant blieb, ließen sich nach Behandlung mit 50 nM MG132 mit zunehmender Inkubationszeit weniger polyubiquitinierte Proteine nachweisen.

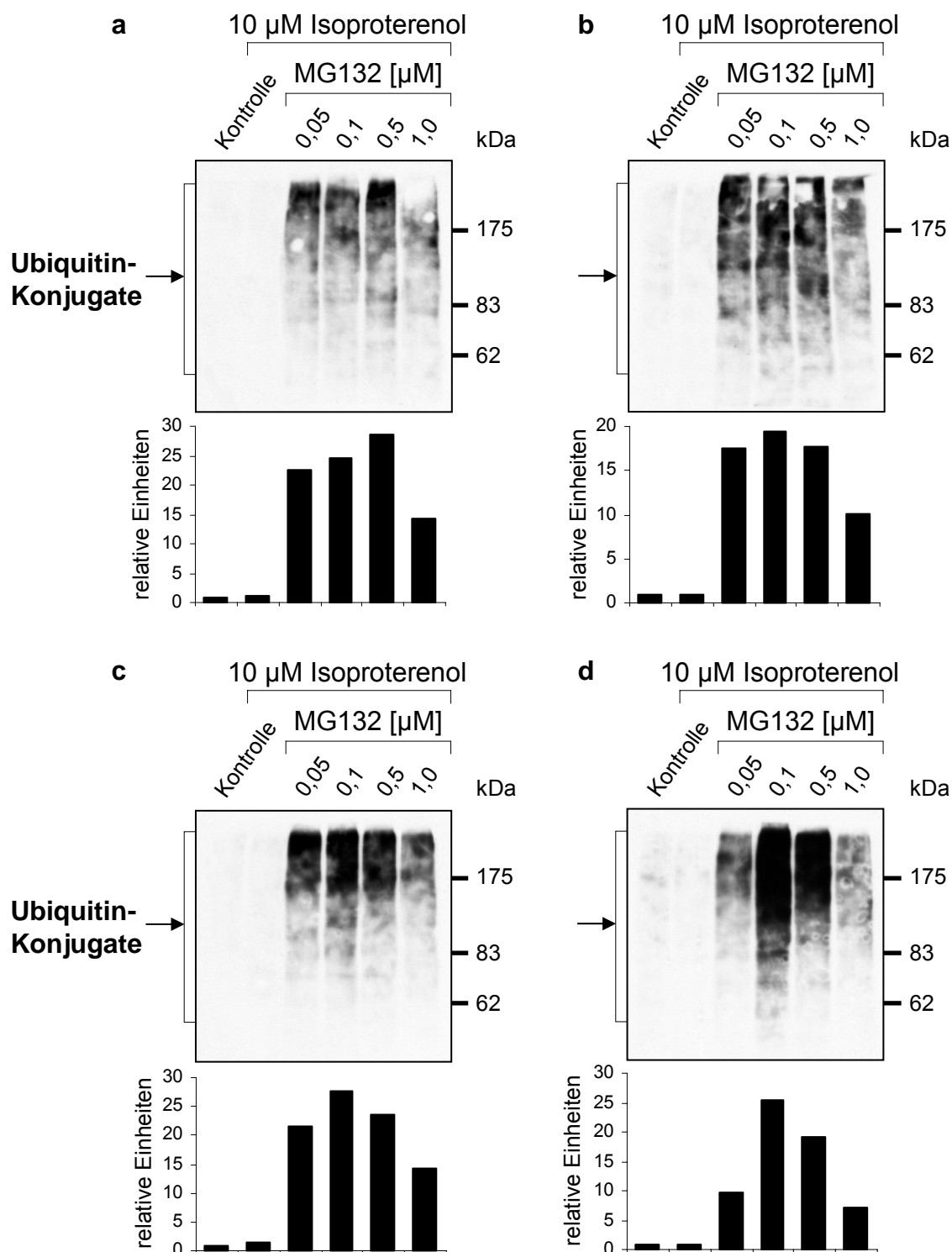


Abbildung 21: Akkumulation polyubiquitinerter Proteine nach Inkubation mit 10 µM Isoproterenol allein und kombiniert mit 0,05-1 µM MG132 über 12 (a), 24 (b), 48 (c) und 72 Stunden (d). Die Diagramme zeigen die relative Proteinmenge genormt auf die Kontrolle nach Densitometrie.

Interessanterweise betrug die Menge der nachweisbaren Ubiquitinkonjugate bei Inhibition mit 1  $\mu\text{M}$  MG132 zu allen untersuchten Zeitpunkten nur ca. 50% der jeweiligen, mit niedriger konzentriertem MG132 erreichten Höchstmenge.

### 3.2.2 Bestimmung der Aktivität des Proteasoms mittels fluorogener Substrate

Um die Aktivität der Proteasomen durch Messung der Fluoreszenz nach Abbau fluorogener Substrate zu bestimmen, wurden NRC mit 10  $\mu\text{M}$  Isoproterenol allein und kombiniert mit 0,05-1  $\mu\text{M}$  MG132 inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen vorsichtig lysiert und die proteasomale Aktivität durch Zugabe von Suc-LLVY-MCA und anschließende Messung der Fluoreszenz bestimmt. Die Fluoreszenz ist dabei proportional zum Abbau des Suc-LLVY-MCA und damit proportional zur Aktivität der Proteasomen.

Wie aus Abbildung 22 ersichtlich führte Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Isoproterenol allein zu keiner signifikanten Änderung der proteasomalen Aktivität im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,127$ ). Dagegen bewirkte die Kombination mit MG132 eine dosisabhängige Reduktion der Aktivität im Vergleich zu ausschließlich mit Isoproterenol behandelten Zellen. So resultierte der Einsatz von 0,05  $\mu\text{M}$  MG132 in einer Aktivitätsverminderung um 54% ( $p = 0,002$ ). Bei 0,1  $\mu\text{M}$  waren es bereits 76% ( $p < 0,001$ ) und bei den höheren Dosen 88% (0,5  $\mu\text{M}$ ,  $p = 0,002$ ) bzw. 90% (1  $\mu\text{M}$  MG132,  $p = 0,002$ ).

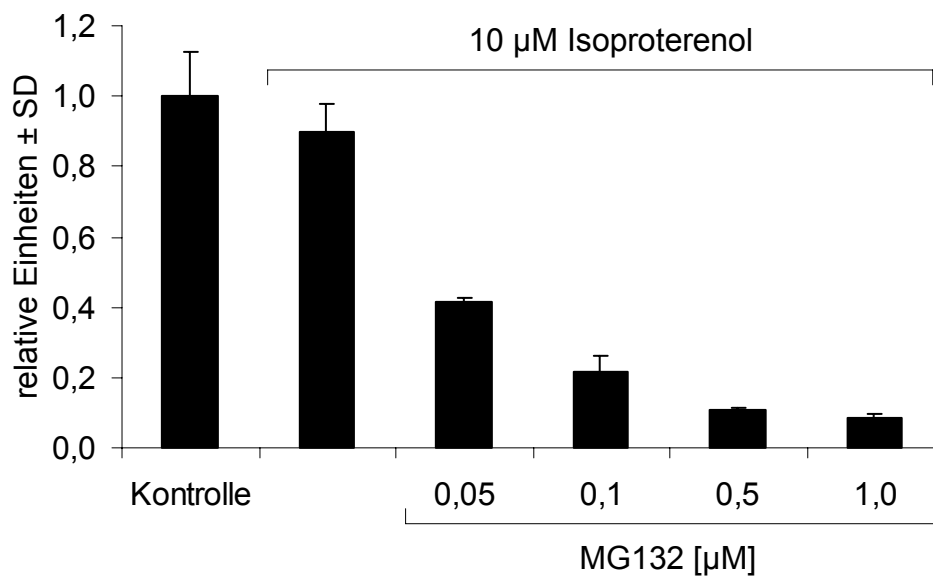


Abbildung 22: Aktivität des Proteasoms nach 48-stündiger Inkubation mit 10 µM Isoproterenol und 0,05-1 µM MG132. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 6$ ) der Fluoreszenz nach Abbau fluorogener Substrate (Suc-LLVY-MCA).

### 3.2.3 Transiente Transfektionen mit Ub<sup>G76V</sup>-GFP

Eine weitere Möglichkeit, die effiziente Hemmung des Proteasoms zu zeigen, ist der Nachweis der Akkumulation ubiquitiniert GFP nach Transfektion mit Ub<sup>G76V</sup>-GFP. Abbildung 23 zeigt die Anzahl fluoreszierender Zellen pro Sichtfeld nach Transfektion und 24- bzw. 48-stündiger Stimulation mit 10 µM Isoproterenol und 0,05-1 µM MG132. In der Kontrollgruppe waren keine fluoreszierenden Zellen sichtbar. Ausschließlich mit Isoproterenol behandelte Zellen fluoreszierten nach 24 Stunden nur sehr vereinzelt mit einer leichten Zunahme nach 48 Stunden. Dagegen ließ sich nach Inkubation mit MG132 ein deutlicher, zeit- und dosisabhängiger Anstieg der Zahl fluoreszierender Zellen von rund 3 pro Sichtfeld nach 24-stündiger Behandlung mit 50 nM MG132 auf bis zu 15 Zellen pro Sichtfeld nach 48 Stunden und 1 µM MG132 dokumentieren ( $p < 0,001$ ).

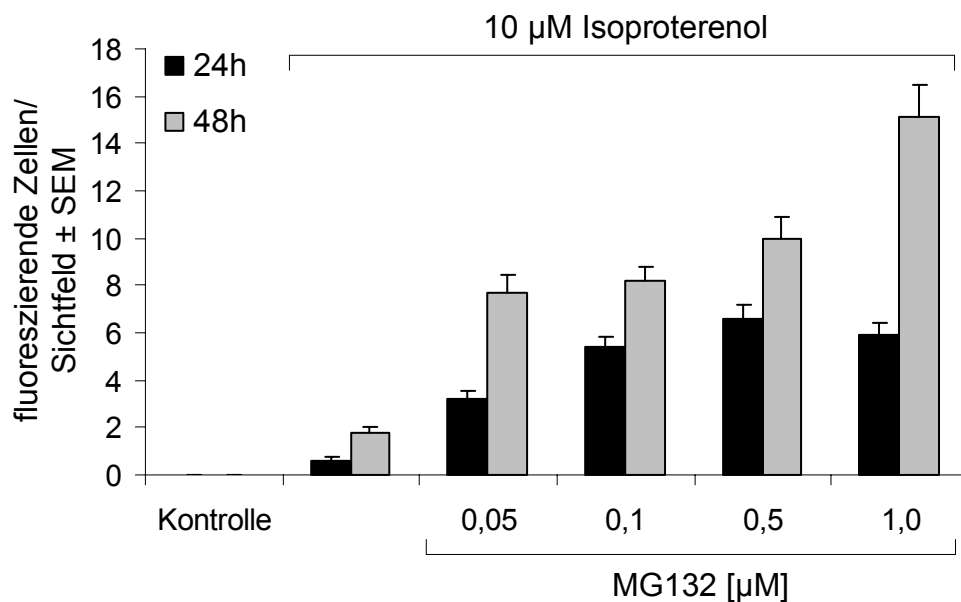


Abbildung 23: Fluoreszierende Zellen/ Sichtfeld nach Transfektion mit Ub<sup>G76V</sup>-GFP und 24- bzw. 48-stündiger Stimulation mit 10 µM Isoproterenol und 0,05-1 µM MG132. Das Diagramm zeigt Mittelwerte ± SEM (n = 10).

### 3.3 Mögliche Mechanismen der Hypertrophiesuppression

#### 3.3.1 Signaltransduktion via ERK 1/2

Um zu klären, ob die Beeinflussung intrazellulärer Signalwege eine der Ursachen des antihypertrophen Effekts der proteasomalen Inhibition sein könnte, wurde mittels Western Blot Analysen der Aktivierungsgrad der extracellular signal regulated kinases 1/2 (MAPK p44/42) untersucht. Dazu wurden NRC 4 Stunden mit Proteasominhibitoren inkubiert und anschließend für 10 bzw. 20 Minuten mit 10% FCS, 50 µM Isoproterenol oder 100 µM Phenylephrin stimuliert. In Vorversuchen zeigte sich, dass bei Stimulation mit FCS und Phenylephrin die Aktivierung der ERK nach 10 Minuten ihr Maximum erreichte, während bei Behandlung mit Isoproterenol die stärkste Aktivierung nach 20 Minuten zu messen war (nicht gezeigt). Dementsprechend wurden die Stimulationszeiten den verschiedenen Stimuli angepasst.

Nach Stimulation wird nur ein gewisser Teil des gesamten Pools an ERK phosphoryliert. Der Großteil verbleibt in der inaktiven, nicht-phosphorylierten

Form. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der ermittelte Anteil phosphorylierter ERK auf die Menge der inaktiven Form abgeglichen.

Abbildung 24 zeigt eine Stimulation mit 10% FCS nach Vorinkubation mit 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  MG132. In der unstimulierten Kontrolle sind phosphorylierte Formen der ERK kaum nachweisbar. Durch Vorinkubation mit 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  MG132 ließ sich die Menge aktivierter ERK sogar noch weiter senken. Mit FCS stimulierte Zellen ohne MG132-Behandlung zeigen dagegen eine starke Zunahme phosphorylierter ERK um Faktor 39. Diese Aktivierung konnte durch Inhibition des Proteasoms drastisch reduziert werden.

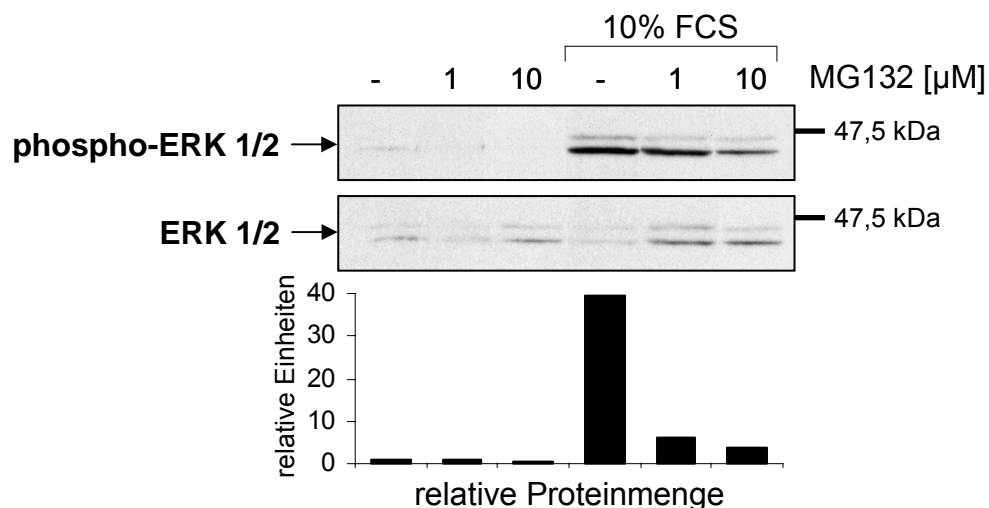


Abbildung 24: Veränderung des Anteils der aktiven Form von ERK 1/2 nach 4-stündiger Inkubation mit MG132 und 10-minütiger Stimulation mit 10% FCS. Das Diagramm zeigt die relative Proteinmenge der phosphorylierten ERK 1/2 abgeglichen auf die inaktive Form und genormt auf die Kontrolle nach Densitometrie.

In Abbildung 25 sind die Ergebnisse des Versuchs nach Stimulation mit Phenylephrin dargestellt. Auch hier findet sich bei der unbehandelten Kontrolle nur eine geringe Menge aktiver ERK. Dieser Anteil lässt sich durch Vorinkubation mit MG132 weiter deutlich reduzieren. Phenylephrin bewirkt eine Zunahme der phosphorylierten ERK um mehr als 300%. Durch Vorinkubation mit MG132 wurde

die PE-induzierte Aktivierung der ERK nahezu vollständig inhibiert.

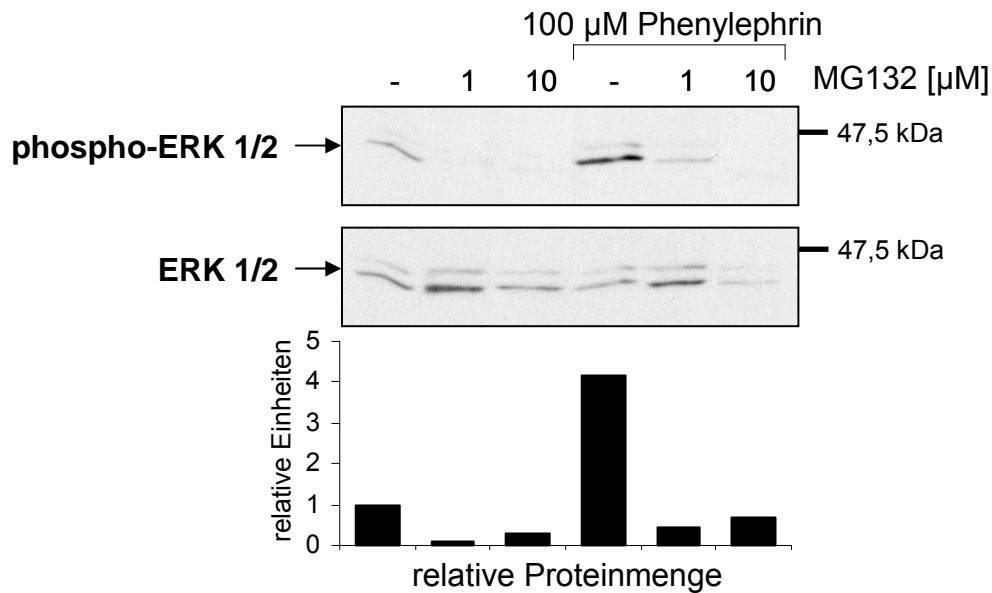


Abbildung 25: Veränderung des Anteils der aktiven Form von ERK 1/2 nach 4-stündiger Inkubation mit MG132 und 10-minütiger Stimulation mit 100 μM Phenylephrin. Das Diagramm zeigt die relative Proteinmenge der phosphorylierten ERK abgeglichen auf die inaktive Form und genormt auf die Kontrolle nach Densitometrie.

Wie aus Abbildung 26 ersichtlich verringerte Vorinkubation mit 1 μM MG132 den Anteil phosphorylierter ERK im Vergleich zur Kontrolle erneut deutlich. Stimulation mit Isoproterenol zu einer Erhöhung der Menge aktivierter ERK um mehr als 300%. Vorbehandlung mit 1 μM MG132 reduzierte diesen Effekt um mehr als die Hälfte.



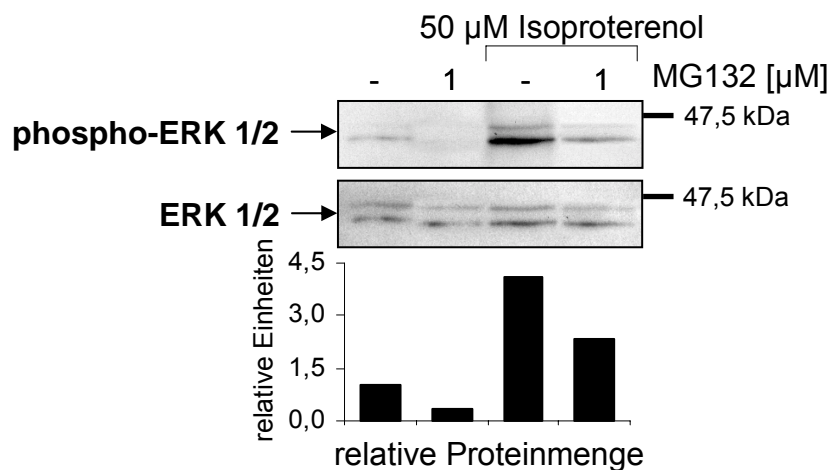


Abbildung 26: Veränderung des Anteils der aktiven Form von ERK 1/2 nach 4-stündiger Inkubation mit MG132 und 20-minütiger Stimulation mit 50 µM Isoproterenol. Das Diagramm zeigt die relative Proteinmenge der phosphorylierten ERK abgeglichen auf die inaktive Form und genormt auf die Kontrolle nach Densitometrie.

In Abbildung 27 sind die Ergebnisse nach Vorinkubation mit MG262 dargestellt. Auch hier führte Vorinkubation mit dem Proteasominhibitor zur Verringerung des aktivierten Anteils der ERK in unstimulierten Zellen. Stimulation mit Isoproterenol erhöhte in diesem Versuch die Menge der aktiven Form auf das Fünffache. Vorinkubation mit MG262 halbierte den Anteil der phosphorylierten ERK.

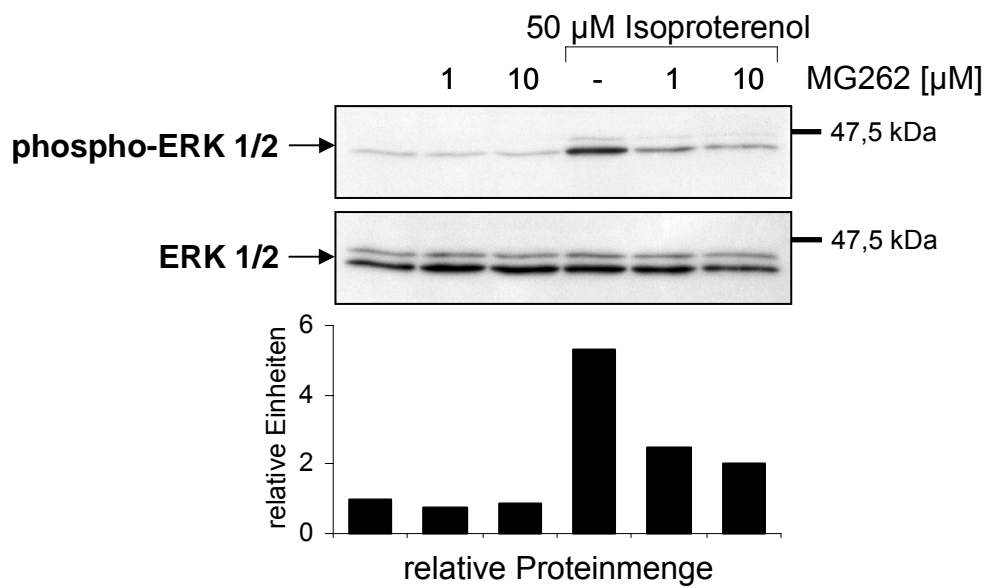


Abbildung 27: Veränderung des Anteils der aktiven Form von ERK 1/2 nach 4-stündiger Inkubation mit MG262 und 20-minütiger Stimulation mit 50  $\mu$ M Isoproterenol. Das Diagramm zeigt die relative Proteinmenge der phosphorylierten ERK abgeglichen auf die inaktive Form und genormt auf die Kontrolle nach Densitometrie.

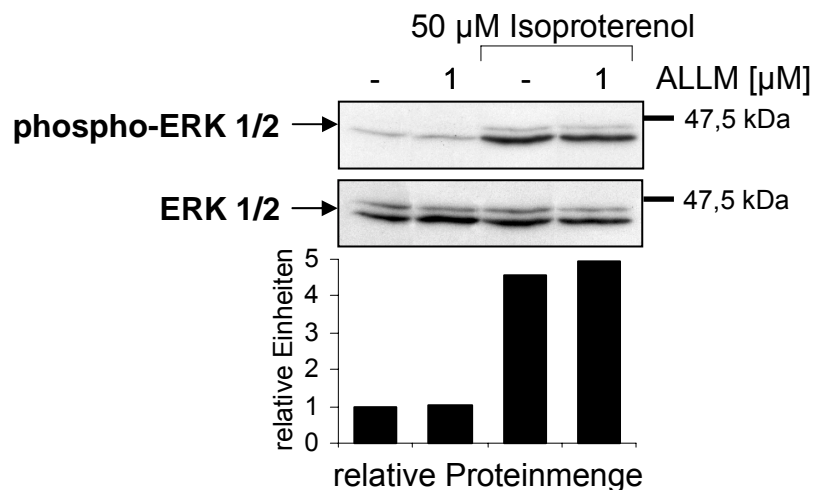


Abbildung 28: Veränderung des Anteils der aktiven Form von ERK 1/2 nach 4-stündiger Inkubation mit ALLM und 20-minütiger Stimulation mit 50  $\mu$ M Isoproterenol. Das Diagramm zeigt die relative Proteinmenge der phosphorylierten ERK abgeglichen auf die inaktive Form und genormt auf die Kontrolle nach Densitometrie.

Abbildung 28 ist zu entnehmen, dass der Protease-Inhibitor ALLM keinen Einfluss auf die Aktivierbarkeit der ERK 1/2 zeigte.

### 3.3.2 Untersuchung der Aktivität von nuclear factor kappa B

Die inaktive Form des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B findet sich im Zytosol gebunden an I $\kappa$ B. Ein wichtiger Schritt in seiner Aktivierung ist die Abspaltung und der schnelle proteasomale Abbau dieses inhibitorisch wirkenden Proteins.

Um den Einfluss des inhibierten Proteasoms auf die Aktivität von NF $\kappa$ B zu untersuchen, wurde ein Luciferase-Reportergenkonstrukt, bei dem NF $\kappa$ B-Bindungsstellen als Promoter dienen, verwendet. Wie Abbildung 29 entnehmbar konnte nach 24-stündiger Behandlung mit 50  $\mu$ M Isoproterenol eine Erhöhung der Aktivität von NF $\kappa$ B um 78% ( $p < 0,001$ ) gemessen werden.

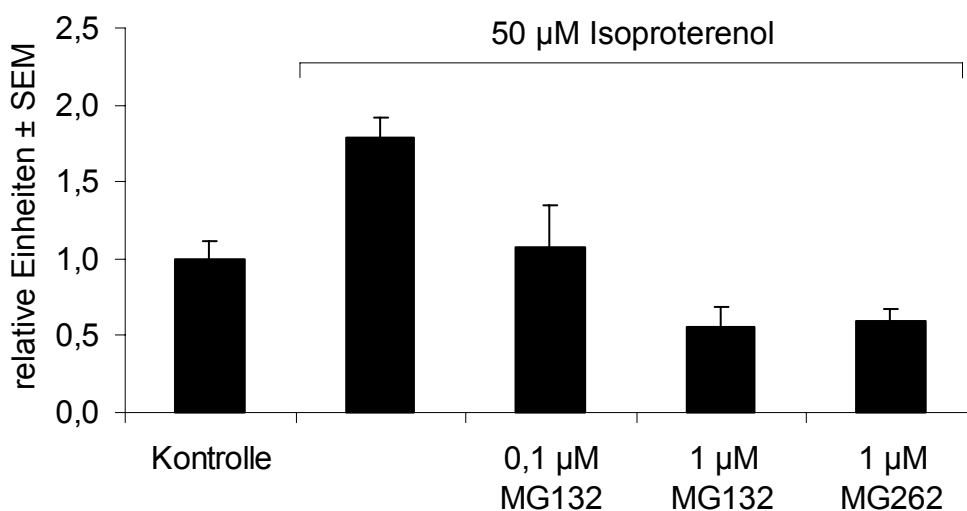


Abbildung 29: Veränderung der Aktivität von NF $\kappa$ B nach 24-stündiger Inkubation mit 50  $\mu$ M Isoproterenol allein und kombiniert mit MG132 oder MG262. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ) genormt auf die Kontrolle.

Wurden die Zellen zusätzlich mit 0,1  $\mu$ M MG132 inkubiert, ergab sich eine Verminderung der Aktivität im Vergleich zu ausschließlich mit Isoproterenol behandel-

ten Zellen um 40% ( $p = 0,038$ ). Erhöhung der Dosis auf 1  $\mu\text{M}$  MG132 bewirkte eine Reduktion um 69% ( $p = 0,001$ ). Wurde Isoproterenol mit 1  $\mu\text{M}$  MG262 kombiniert, reduzierte sich die Aktivität um 67% ( $p < 0,001$ ).

### 3.3.3 Untersuchung der Aktivität des activating protein 1

Im Gegensatz zu NF $\kappa$ B ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP1 nicht direkt vom Proteasom abhängig. Vielmehr ist bekannt, dass Untereinheiten des Dimers AP1 (z. B. c-jun und c-fos) über das Proteasom abgebaut werden. Dem entsprachen die mit einem Luciferase-Reportergenkonstrukt mit AP1-Bindungsstellen erhobenen Befunde: Blockade des Proteasoms führte zu einer Erhöhung der Aktivität des Transkriptionsfaktors.

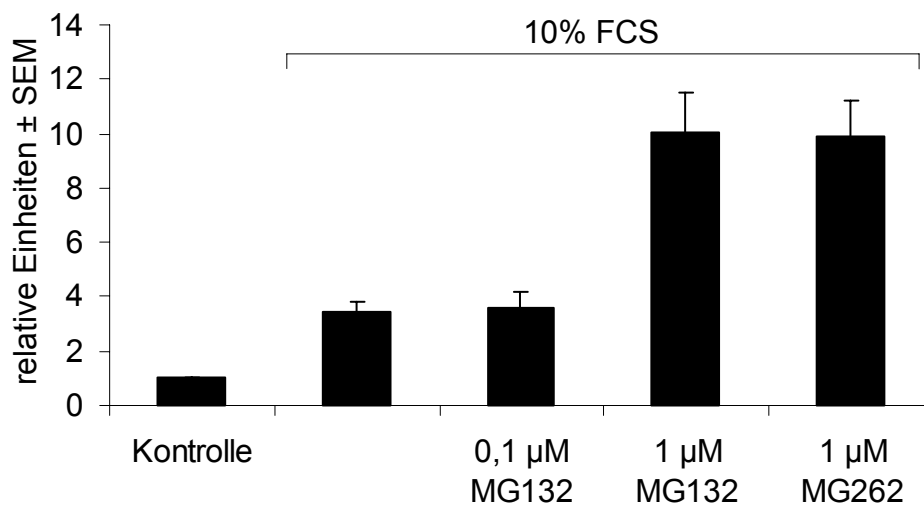


Abbildung 30: Veränderung der Aktivität von AP1 nach 24-stündiger Inkubation mit 10% FCS allein und kombiniert mit MG132 oder MG262. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 9$ ) genormt auf die Kontrolle.

Wie Abbildung 30 zeigt, resultierte die 24-stündige Inkubation mit 10% FCS in einer Erhöhung der transkriptionellen Aktivität an der AP1-Bindungsstelle um 244%

( $p < 0,001$ ). Gleichzeitige Behandlung mit  $0,1 \mu\text{M}$  MG132 erbrachte keine signifikante Veränderung im Vergleich zu ausschließlich mit FCS behandelten Zellen ( $p = 0,786$ ). Dagegen stieg die Aktivität bei Inkubation mit FCS und  $1 \mu\text{M}$  MG132 noch um 192% ( $p < 0,001$ ). Auch durch Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  MG262 nahm die Aktivität noch um 187% ( $p < 0,001$ ) zu.

Abbildung 31 stellt die Ergebnisse nach Stimulation mit  $50 \mu\text{M}$  Isoproterenol dar. Analog zu den mit FCS behandelten Zellen stieg die Aktivität nach Zugabe von Isoproterenol um 164% ( $p < 0,001$ ) an. Kombination mit  $0,1 \mu\text{M}$  MG132 zeigte wiederum keinen signifikanten Einfluss ( $p = 0,097$ ) im Vergleich zu ausschließlich mit Isoproterenol inkubierten NRC. Der Einsatz von  $1 \mu\text{M}$  MG132 erhöhte die Aktivität um 67% ( $p < 0,052$ ).  $1 \mu\text{M}$  MG262 erbrachte einen Zuwachs von 71% ( $p = 0,034$ ).

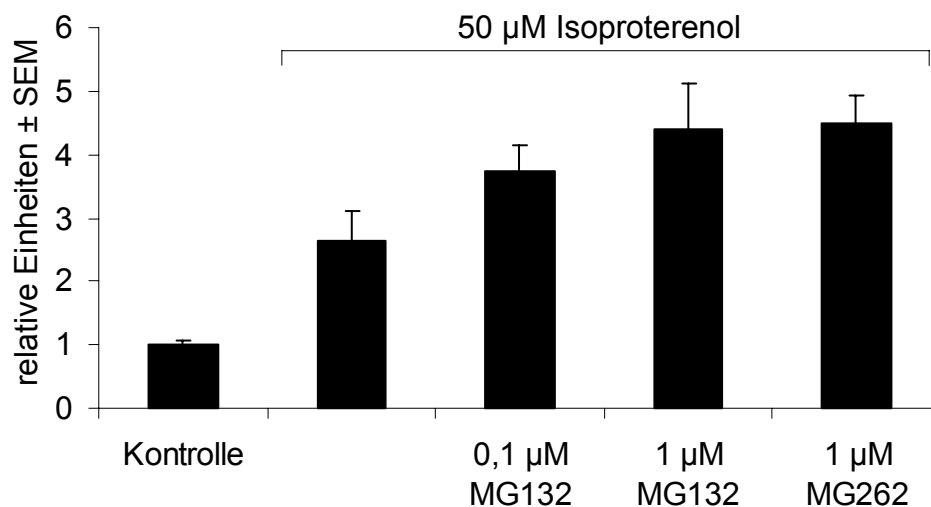


Abbildung 31: Veränderung der Aktivität von AP1 nach 24-stündiger Inkubation mit  $50 \mu\text{M}$  Isoproterenol allein und kombiniert mit MG132 oder MG262. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 9$ ) genormt auf die Kontrolle.

Abbildung 32 zeigt die Befunde nach Inhibition des Proteasoms ohne gleichzeitige Zugabe von hypertrophen Stimuli. Behandlung mit MG132 resultierte dabei in einer Erhöhung der transkriptionellen Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen um Faktor 4,7 (0,1  $\mu$ M,  $p < 0,001$ ) bzw. um Faktor 4,9 (1  $\mu$ M,  $p < 0,001$ ). Durch 1  $\mu$ M MG262 stieg die Aktivität um Faktor 3,8 ( $p < 0,001$ ).

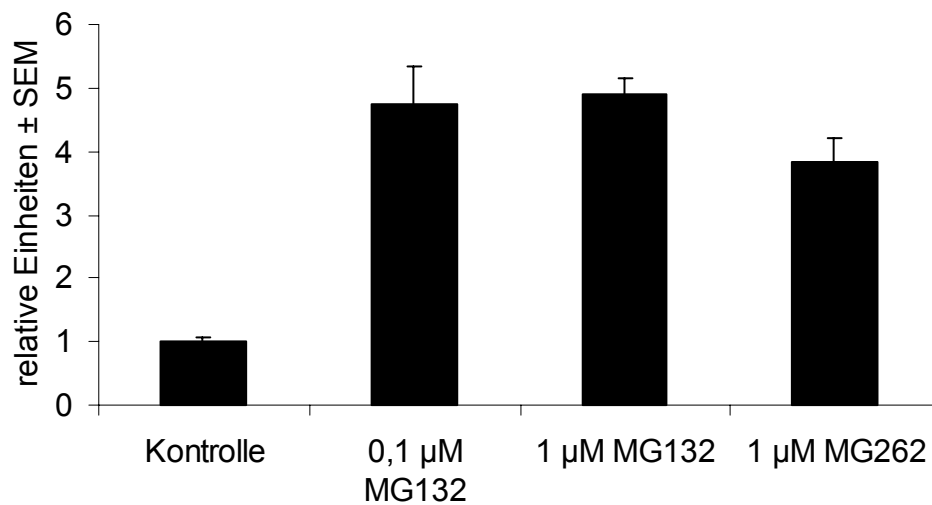


Abbildung 32: Veränderung der Aktivität von AP1 nach 24-stündiger Inkubation mit MG132 oder MG262. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 9$ ) genormt auf die Kontrolle.

## 4 Diskussion

Am Beginn dieser Arbeit stand die Hypothese, dass sich die Hypertrophie kardialer Myozyten durch die Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems supprimieren lässt. Diese These konnte durch zahlreiche Befunde gestützt werden.

Dazu wurden die Zellen zunächst auf Merkmale der Hypertrophie und eine mögliche Beeinflussung durch Behandlung mit Proteasominhibitoren hin untersucht. Dabei konnte ein deutlich vermindertes hypertrophes Zellwachstum, ein verringerter Gehalt an Hypertrophiemarkerproteinen, eine reduzierte Expression des Markergens BNP sowie eine Abnahme der Protein- und RNA-Synthese gezeigt werden. Ebenso konnte eine reduzierte rRNA-Synthese gemessen werden. Der Nachweis der Spezifität des Effekts der Proteasominhibitoren konnte durch Versuche mit ALLM, einem Inhibitor zellulärer Proteasen (Kalpaine und Kathepsine), der keinen signifikanten Einfluss auf die untersuchten Kennzeichen der Hypertrophie hatte, erbracht werden.

Im folgenden wurde die Inhibition des Proteasoms dokumentiert und quantifiziert. Dabei konnte zunächst durch Western Blot Analysen gezeigt werden, dass bereits geringe Dosen MG132 und kurze Inkubationszeiten eine signifikante Akkumulation polyubiquitinerter Proteine bewirken. Ferner wurde die konzentrationsabhängige Abnahme der Aktivität des Proteasoms durch Messung des Abbaus fluorogener Substrate bestimmt. Darüber hinaus resultierte Behandlung mit Proteasominhibitoren in einer konzentrations- und zeitabhängigen Anhäufung von ubiquitinierten GFP in mit Ub<sup>G76V</sup>-GFP transfizierten Myozyten.

Um mögliche Mechanismen des antihypertrophen Effekts der Proteasominhibitoren aufzudecken, wurde die Aktivität von MAP Kinasen und Transkriptionsfaktoren untersucht. Dabei zeigte sich in Western Blot Analysen eine deutliche Abnahme der Aktivierbarkeit der ERK 1/2. Mit Reportergenkonstrukten konnte eine deutlich reduzierte Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB dokumentiert werden. Demgegenüber stand eine Erhöhung der transkriptionellen Aktivität des Transkriptionsfaktors activating protein 1.

## **4.1 Kennzeichen der Hypertrophie kardialer Myozyten**

### **4.1.1 Reduktion des hypertrophen Zellwachstums**

Zu den auffälligsten und am leichtesten zu beobachtenden Eigenschaften hypertrophierter Zellen zählt die Flächenzunahme. Analog zu Befunden von Messerli et al. konnte auch in Rahmen dieser Arbeit bei neonatalen Rattenkardiomyozyten eine Zunahme der Fläche um Faktor 2 bis 3 nach Behandlung mit Hypertrophie-induzierenden Agonisten gemessen werden (Messerli et al. 1993). Dieses Wachstum verringerte sich unabhängig vom hypertrophen Stimulus durch Koinkubation mit Proteasominhibitoren dosisabhängig.

Während die 72-stündige Behandlung mit 1  $\mu$ M MG132 einen zytotoxischen Einfluss auf die Kardiomyozyten ausübte (Desintegration des kontraktile Apparats, Abnahme der lebenden Zellen), hatten niedrigere Dosen auch über längere Inkubationszeiten (> 72 Stunden) keinen erkennbaren Einfluss auf die Vitalität der Zellen. Dies deckt sich mit Befunden von Drexler et al., die zeigen konnten, dass postmitotische Zellen im Vergleich zu proliferierenden Zellen eine relativ hohe Resistenz gegenüber Proteasominhibitoren haben (Drexler et al. 2000).

Interessanterweise beschränkte sich der Effekt der Proteasominhibitoren nicht auf eine reine Wachstumshemmung; vielmehr zeigten die Zellen spezifische Veränderungen in der Morphologie: bereits nach Behandlung mit 50 nM MG132 bildeten die Zellen innerhalb von 24 bis 48 Stunden eine spindelförmige Gestalt mit langen bipolaren Zellausläufern aus. Eine so deutliche Reaktion auf derart niedrige Konzentrationen findet sich in der Literatur bisher nicht beschrieben. Interessanterweise ließ sich diese Veränderung der Morphologie in unserem Labor auch bei anderen Zelltypen (z. B. Endothelzellen, glatte Muskelzellen) beobachten, so dass es sich hierbei möglicherweise nicht um einen zell- sondern vielmehr proteasomspezifischen Effekt handelt. Als Ursache dafür denkbar ist die Stabilisierung von monomeren GTPasen der rho-Familie (rac, cdc42), die für die Organisation des Aktin-Zytoskeletts verantwortlich sind (Tapon und Hall 1997). In der Tat konnte kürzlich gezeigt werden, dass rac über das Proteasom abgebaut wird und die Inhibition des Proteasoms zu einer Daueraktivierung der Substrate in der Signaltransduktionskaskade unterhalb von rac führt (Lerm et al. 2002). Für einen Einfluss auf die



Organisation des Zytoskeletts spricht weiter eine Arbeit von Fenteany et al., die zeigen konnten, dass Proteasominhibitoren den Auswuchs von Neuriten bei Neuroblastomzellen induzieren (Fenteany et al. 1994).

Erstaunlicherweise führt die alleinige Behandlung mit Proteasominhibitoren zu einer Zunahme der Zellfläche (nicht gezeigt). Darüber hinaus erscheinen die Zellen – zumindest bei niedrig dosierter Gabe von MG132 – vitaler. Als Ursache lässt sich der bereits beschriebene kardioprotektive Effekt der Proteasominhibitoren durch Induktion von Hitzeschockproteinen diskutieren (Stangl et al. 2002). Weitere mögliche Ursachen werden in Abschnitt 4.3 besprochen.

Das zur Kontrolle der Spezifität des Effekts eingesetzte ALLM konnte weder das hypertrophe Zellwachstum noch die Zellmorphologie signifikant beeinflussen.

### 4.1.2 Abnahme des Gehalts an Hypertrophiemarkerproteinen

Hypertrophe Stimuli bewirken eine quantitative und qualitative Veränderung der Proteinsynthese: neben einer allgemeinen Synthesesteigerung kommt es zur überproportionalen Zunahme bestimmter Proteine, die als Hypertrophiemarker bezeichnet werden. Zu den durch eine Vielzahl verschiedener hypertropher Stimuli induzierbaren Markern gehören die in dieser Arbeit untersuchten  $\beta$ -myosin heavy chain ( $\beta$ MHC),  $\alpha$ -sarcomeric actin ( $\alpha$ SA) und  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA).

Die Behandlung mit Isoproterenol resultierte in einer deutlichen Steigerung der Menge von  $\beta$ MHC und  $\alpha$ SMA. Dies deckt sich mit Befunden von Rupp et al. ( $\beta$ MHC) und Simpson et al. ( $\alpha$ SA), die eine Zunahme der beiden Proteine nach Behandlung mit GPCR-Agonisten zeigen konnten (Rupp et al. 1991, Simpson et al. 1989). Unbeeinflusst von der Isoproterenol-Behandlung blieb dagegen die Menge von  $\alpha$ -smooth muscle actin, zu dem sich in der Literatur auch keine Hinweise auf eine Beeinflussbarkeit durch GPCR-Agonisten finden ließen.

Unabhängig von der Induzierbarkeit der drei Proteine durch Isoproterenol nahm ihre Menge bei gleichzeitiger Inkubation mit Proteasominhibitoren dosisabhängig ab. Der Effekt des MG132 war dabei bereits ab einer Konzentration von 0,1  $\mu$ M so

ausgeprägt, dass die Anteile von  $\beta$ MHC und  $\alpha$ SMA an der Gesamtproteinmenge noch unter die bei den Kontrollen gemessenen Werte sanken.

Dies erlaubt den Schluss, dass die Inhibition des Proteasoms die Expression von Hypertrophiemarkern signifikant verringert.

### 4.1.3 Reduzierte BNP-Expression

Das vor allem im Ventrikel gebildete brain (oder B-type) natriuretic peptide (BNP) ist ebenso wie sein Vorhof-Analogon, der atriale natriuretische Faktor (ANF), ein sensibler Marker der Hypertrophie. Im Unterschied zu ANF reagiert es auf Behandlung mit hypertrophen Stimuli jedoch schneller mit einer Steigerung der Expressionsrate (Hanford et al. 1994) und scheint auch in klinischen Studien als Marker für Hypertrophie dem ANF überlegen (Yamamoto et al. 1996). In Übereinstimmung mit Befunden von Hanford et al. stieg die Expressionsrate von BNP um Faktor 10 nach Behandlung mit Isoproterenol. Gleichzeitige Inkubation mit MG132 resultierte in einer Halbierung des Effekts des Isoproterenols.

Dies zeigt, dass analog zu den Western Blot Daten auch mit Reportergenassays eine verminderte Markerexpression nach Behandlung mit Proteasominhibitoren beobachtet werden kann.

### 4.1.4 Abnahme der Proteinsynthese

Durch Inkorporation der radioaktiv markierten Aminosäure Leucin wurde die Proteinsynthese gemessen. Behandlung mit Serum führte hierbei zu einer Zunahme des inkorporierten Leucins um Faktor 3 bis 4. Während gleichzeitige Behandlung mit niedrig dosiertem MG132 (0,05-0,1  $\mu$ M) keinen signifikanten Einfluss auf die Syntheserate hatte, bewirkten höhere Konzentrationen (0,5-1  $\mu$ M) eine Halbierung des Effekts des Serums.

Vergleichbar mit Ergebnissen von Pinson et al. resultierte Inkubation mit Isoproterenol in einer Zunahme der Syntheserate um 50% (Pinson et al. 1993). Im Gegensatz zu den mit Serum durchgeführten Versuchen führte die Behandlung mit

MG132 bereits in niedrigen Dosen zu einer vollständigen Kompensation der Wirkung des Isoproterenols. Dabei lag die ermittelte Syntheserate noch unter den bei den unbehandelten Kontrollen gemessenen Werten.

Die Inhibition zellulärer Proteasen durch ALLM hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Syntheserate.

### 4.1.5 Abnahme der RNA-Synthese

Analog zur Messung der Proteinsynthese wurde auch die RNA-Synthese mittels Inkorporation des radioaktiv markierten Nukleosids Uridin ermittelt.

Auch hier konnte die Synthese durch Behandlung mit Serum um Faktor 2,5 bis 4 gesteigert werden. Niedrige Dosen von MG132 hatten wiederum keinen Einfluss auf die Syntheserate; höhere Konzentrationen bewirkten eine dosisabhängige Reduktion des Effekts des Serums. Inkubation mit 1  $\mu$ M MG132 hob die Wirkung des Serums komplett auf.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Pinson et al. ließ sich auch durch Inkubation mit Isoproterenol die RNA-Synthese steigern: mit einer Zunahme um 80% lag sie etwa im für Endothelin-1 beschriebenen Bereich (Xu et al. 1999). Ähnliche Befunde wie bei der Proteinsynthese fanden sich bei Koinkubation mit MG132: bereits niedrige Dosen des Proteasominhibitors reduzierten den synthesesesteigernden Effekt des Sympathomimetikums auf das Niveau der unbehandelten Kontrollen.

Die Behandlung mit ALLM zeigte auch hier keinen signifikanten Einfluss auf die Syntheserate.

Die Beobachtung, dass zur Reduktion des synthesesesteigernden Effekts des Serums höhere Dosen von MG132 notwendig waren als bei Einzelstimulationen mit GPCR-Agonisten, korreliert mit Western Blot Analysen polyubiquitinerter Proteine. Auch hier waren im Vergleich zu Versuchen mit GPCR-Agonisten bei Behandlung mit FCS höhere Konzentrationen von MG132 notwendig, um eine signifikante Anhäufung der Ubiquitinkonjugate zu erzielen (nicht gezeigt). Als Ursache für diesen

Effekt lässt sich diskutieren, dass das Serum zahlreiche Agonisten enthält (Wachstumsfaktoren, Katecholamine, Schilddrüsenhormone etc.) und so in der Lage ist, eine Vielzahl verschiedener Signaltransduktionskaskaden zu aktivieren. Es ist denkbar, dass durch die Aktivierung multipler Signalwege der Effekt der Proteasominhibitoren teilweise kompensiert wird. Für diese Hypothese spricht, dass die untersuchten Kennzeichen einer Hypertrophie nach Behandlung mit Serum grundsätzlich stärker zunahmten als bei Einzelstimulationen mit GPCR-Agonisten.

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass sich mit Proteasominhibitoren die Zunahme der Protein- und RNA-Synthese in der Hypertrophie reduzieren lässt. Unklar ist jedoch, ob Proteasominhibitoren direkt in die Synthese eingreifen oder ob sie durch Interaktion mit Signalkaskaden die Aktivierung der Transkription und der Translation indirekt verhindern. Ebenfalls nicht geklärt ist, ob die verminderte Proteinsynthese Folge der reduzierten RNA-Synthese ist.

### 4.1.6 Abnahme der ribosomalen RNA-Synthese

Die mit Hilfe der Inkorporation von Uridin gewonnenen Daten geben ausschließlich Auskunft über die Veränderung der Gesamt-RNA-Synthese und lassen daher keinen Schluss auf Veränderungen der Synthese von ribosomaler, messenger und transfer RNA zu. Für die Synthese der RNA-Unterformen sind dabei verschiedene DNA-abhängige RNA-Polymerasen verantwortlich: Typ I für rRNA, Typ II für mRNA und Typ III für tRNA. Um differenziertere Informationen über die Veränderung der rRNA-Synthese zu erhalten, wurde daher die mRNA-Synthese (bei Vernachlässigung der tRNA-Synthese) mit Hilfe von  $\alpha$ -Amanitin, einem Inhibitor der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II, blockiert.

Analog zu den Befunden aus Abschnitt 4.1.5 stieg die RNA-Synthese bei Behandlung mit FCS um Faktor 5 und konnte mit gleichzeitiger Behandlung mit MG132 deutlich reduziert werden. Wurde die mRNA-Synthese durch Inkubation mit  $\alpha$ -Amanitin inhibiert, halbierte sich die RNA-Synthese unstimulierter Zellen. Dies deckt sich mit der bekannten Tatsache, dass mRNA- und rRNA-Synthese je etwa die Hälfte der RNA-Synthese ausmachen (Hannan und Rothblum 1995). Weiterhin

war die Syntheserate nach Stimulation mit FCS um 39% geringer als bei Zellen, deren mRNA-Synthese nicht blockiert war. Dies legt den Schluss nahe, dass Inkubation mit FCS sowohl die mRNA- als auch die rRNA-Synthese in gleichem Maße stimuliert. Behandlung mit MG132 führte bei den mit  $\alpha$ -Amanitin und FCS behandelten Zellen zu einer Verminderung ihrer Syntheserate um 49%. Blockade der mRNA-Synthese mit  $\alpha$ -Amanitin hatte keinen signifikanten Effekt auf die Syntheserate von Zellen, die mit FCS und MG132 behandelt wurden.

Diese Daten erlauben den Schluss, dass  $\alpha$ -Amanitin keinen signifikanten Einfluss auf die Wirkung des MG132 hatte.

Die ermittelte Inhibition der rRNA-Synthese stellt eine mögliche Erklärung für den antihypertrophen Effekt der Proteasominhibitoren dar. Da bereits im nichthypertrophierten Zustand 90% aller Ribosomen ausgelastet sind (Hannan und Rothblum 1995) und so die Proteinsynthese der Zellen durch ihren Gehalt an Ribosomen limitiert wird (Hannan et al. 1995, Siehl et al. 1985), ist die Neusynthese der Ribosomen, also auch die rRNA-Synthese, ein entscheidender Prozess in der Ausbildung einer Hypertrophie.

### **4.2 Nachweis und Quantifizierung der Inhibition des Proteasoms**

Neben dem Nachweis der Spezifität des Effekts durch Kontrollversuche mit ALLM galt es, den Einfluss der Proteasominhibitoren auf die Aktivität des Proteasoms zu quantifizieren.

#### **4.2.1 Akkumulation polyubiquitinerter Proteine**

Dazu wurden zunächst Western Blot Analysen durchgeführt, mittels derer die Akkumulation polyubiquitinerter Proteine gezeigt werden konnte. Auffallend war hierbei, dass sich Ubiquitinkonjugate bereits bei geringer Dosierung (50 nM MG132) und nach kurzen Inkubationszeiten (6 Stunden) nachweisen ließen. Interessanterweise war die nachweisbare Menge polyubiquitinerter Proteine nach Behandlung mit 0,1  $\mu$ M und 0,5  $\mu$ M MG132 unabhängig von der Inkubationsdauer

größer als nach Inkubation mit der Maximaldosis von 1  $\mu\text{M}$  MG132. Als Ursache dafür könnte diskutiert werden, dass Proteasominhibitoren in höherer Dosierung zytotoxisch wirken (s. o.) und so indirekt die Markierung zum Abbau bestimmter Proteine mit Ubiquitinketten hemmen. Eine andere Erklärungsmöglichkeit liefert die bereits beschriebene Tatsache, dass Proteasominhibitoren zu einer Steigerung der Expression von Proteasomuntereinheiten führen. Es ist daher vorstellbar, dass höhere Konzentrationen von MG132 die Neusynthese von Proteasomuntereinheiten anregen, was in einer partiellen Kompensation der inaktivierten Proteasomen resultieren könnte.

### 4.2.2 Abnahme der Aktivität des Proteasoms

Analog zu den Ergebnissen der Western Blot Analysen konnte durch Bestimmung der Aktivität der Proteasomen im Zelllysate mittels Abbau fluorogener Substrate gezeigt werden, dass schon die 48-stündige Behandlung mit 50 nM MG132 in einer Halbierung der Aktivität des Proteasoms resultierte. Bereits bei 0,5  $\mu\text{M}$  MG132 betrug die Aktivität nur noch 12% des Kontrollwerts. Angesichts der Tatsache, dass zur Messung der Aktivität eine definierte Proteinmenge aus einem Zelllysate eingesetzt wird, wäre bei einer Neusynthese von Proteasomuntereinheiten eine Steigerung der Aktivität zu erwarten, da sich der Anteil der Proteasomen an der Gesamtproteinmenge erhöhen würde. Dass die messbare Aktivität des Proteasoms nach Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  MG132 auf dem gleichem Niveau wie nach Einsatz von 0,5  $\mu\text{M}$  MG132 lag, spricht daher eher gegen die These einer relevanten Neusynthese von Proteasomuntereinheiten.

### 4.2.3 Transfektion mit Ub<sup>G76V</sup>-GFP

Einen interessanten Aspekt erleuchtete die Transfektion von Kardiomyozyten mit Ub<sup>G76V</sup>-GFP. Dem in diesem System als Reportergen dienenden grün fluoreszierenden Protein (GFP) ist eine Kette aus Ubiquitinmolekülen, die nicht durch Ubiquitinhydrolasen abgespalten werden kann, vorgeschaltet. Daher kommt es unmittelbar nach der Synthese des Konstrukts durch die Zellen zum Abbau durch das

26S Proteasom (Stack et al. 2000).

Dabei zeigte sich nicht nur die erwartete zeit- und konzentrationsabhängige Anhäufung der grün fluoreszierenden Proteine durch Inhibition des Proteasoms. Vielmehr konnten auch bei ausschließlich mit Isoproterenol behandelten Zellen vereinzelt fluoreszierende Zellen beobachtet werden, wohingegen bei den unbehandelten Zellen keinerlei Fluoreszenz gemessen werden konnte (Abbildung 33). Begründung hierfür könnte eine verstärkte Synthese der Ub<sup>G76V</sup>-GFP-Moleküle durch die mit einer Hypertrophie einhergehenden Steigerung der allgemeinen Transkriptionsrate sein, ohne dass es zu einer kompensatorischen Steigerung des Abbaus über das Proteasom kommt. Des Weiteren wäre eine physiologische Inhibition des Proteasoms beim Wechsel von der katabolen zur anabolen Stoffwechsellaage denkbar. Es wäre durchaus interessant, diesen Aspekt weiter zu beleuchten, zumal sich in der Literatur so gut wie keine Hinweise darauf finden, wie sich die Aktivität des Proteasoms in der Hypertrophie verändert.

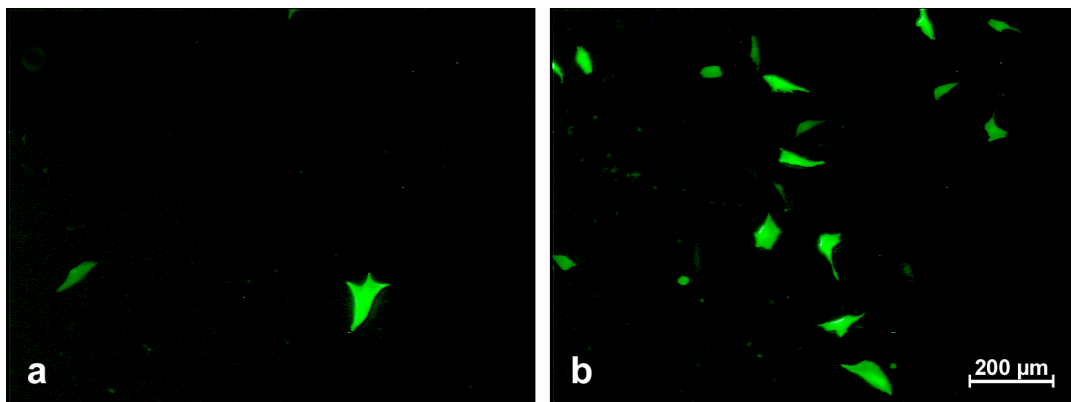


Abbildung 33: Mit Ub<sup>G76V</sup>-GFP transfizierte NRC nach 48-stündiger Behandlung mit 10 µM Isoproterenol allein (a) und kombiniert mit 1 µM MG132 (b).

### 4.3 Mögliche Mechanismen des antihypertrophen Effekts der Proteasominhibitoren

#### 4.3.1 Abnahme der Aktivierbarkeit der MAPK ERK 1/2

Um Ursachen für den antihypertrophen Effekt der Proteasominhibitoren aufzude-

cken, sollte eine mögliche Interaktion des Proteasoms mit dem Ras/ Raf/ ERK Signaltransduktionsweg untersucht werden. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, spielt diese Kaskade in der Vermittlung hypertropher Stimuli eine herausragende Rolle. Yue und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Aktivierung der ERK in der Entwicklung von durch GPCR-Agonisten ausgelöster Hypertrophie von essentieller Bedeutung ist (Yue et al. 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels Western Blot Analysen dokumentiert werden, dass sich die Aktivierbarkeit der ERK 1/2 durch Vorinkubation mit Proteasominhibitoren drastisch reduzieren lässt. Diese Ergebnisse finden sich in Übereinstimmung mit Befunden von Orlowski et al., die eine verringerte Aktivität von ERK nach Behandlung mit Proteasominhibitoren in Tumorzellen zeigen konnten und darin eine Ursache für den beobachteten proapoptotischen Effekt sehen. Ursache für die reduzierte Phosphorylierung der MAPK scheint eine Induktion von dephosphorylierenden MAPK Phosphatasen (MKP, siehe Abbildung 34) zu sein (Orlowski et al. 2002). In der Tat konnte die Induktion von MKP-1 nach Behandlung mit Proteasominhibitoren auch in Rattenkardiomyozyten gezeigt werden (unveröffentlichte Daten, Hartmut Lüss et al., Münster).

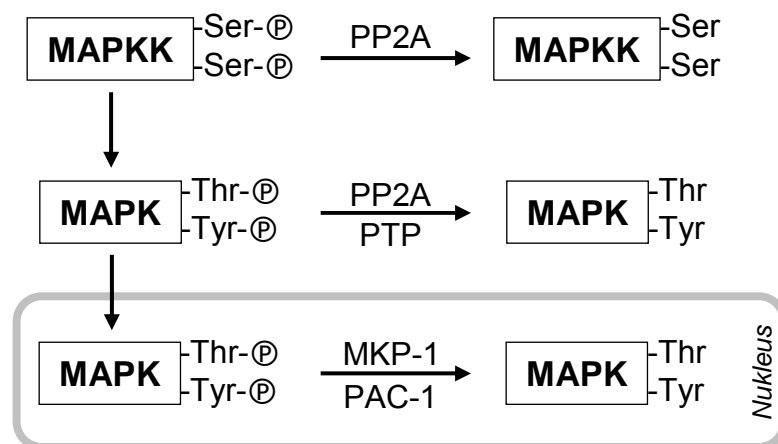


Abbildung 34: Phosphatasen des MAPK-Signalwegs (nach Denhardt 1996).



Interessanterweise könnte eine verminderte ERK Aktivität auch eine Ursache der weiter oben beschriebenen Abnahme der rRNA-Synthese sein: ERK 1/2 aktivieren durch Phosphorylierung den upstream binding factor (UBF), der in der rDNA-Transkription eine wichtige Rolle spielt. Dementsprechend konnten Stefanovsky et al. zeigen, dass die ribosomale Transkription durch Blockade der ERK auf ein basales Niveau zurückführt wird (Stefanovsky et al. 2001).

Trotzdem kann die verminderte Aktivität der ERK nicht alle beobachteten Effekte erklären, da die ERK v. a. in der Steigerung der Proteinsynthese und weniger in der Ausbildung eines spezifischen hypertrophen Genmusters eine Rolle spielen (Sugden und Clerk 1998).

### 4.3.2 Abnahme der Aktivität von nuclear factor kappa B

Wie in der Einleitung bereits angedeutet, handelt es sich bei NF $\kappa$ B um einen zentralen Regulator der zellulären Antwort auf Stress: mehr als 150 Stimuli sind in der Lage, NF $\kappa$ B zu aktivieren, woraufhin die Expression von inzwischen über 150 identifizierten Zielgenen moduliert wird (Pahl 1999). So nimmt NF $\kappa$ B beispielsweise Einfluss auf die Expression von Mediatoren der Reaktion auf Entzündungsreize (TNF $\alpha$ , IL-1), auf Enzyme (Cyclooxygenase, NO-Synthetase) und auf Leukozyten Adhäsionsmoleküle (ICAM, VCAM). Ferner scheint NF $\kappa$ B eine wichtige Rolle in der Ausbildung GPCR-vermittelter Hypertrophie zu spielen (Hirotani et al. 2002); Purcell et al. konnten zeigen, dass Inhibition von NF $\kappa$ B die Wirkung verschiedener hypertropher Stimuli reduzierte bzw. aufhob (Purcell et al. 2001).

Analog zu diesen Befunden konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine gesteigerte Aktivität von NF $\kappa$ B in Reporter-gen-Versuchen nach Behandlung mit Isoproterenol gemessen werden. Diese Aktivitätszunahme ließ sich durch Proteasominhibitoren dosisabhängig reduzieren: bereits 0,1  $\mu$ M MG132 hoben den Effekt des Isoproterenols vollständig auf, höhere Konzentrationen des Proteasominhibitors reduzierten die Aktivität von NF $\kappa$ B noch unter das Niveau der bei den Kontrollen gemessenen Werte.

Diese Befunde sind keinesfalls überraschend; Palombella et al. konnten bereits

1994 zeigen, dass das Proteasom in der Aktivierung von NF $\kappa$ B eine essentielle Rolle spielt (Palombella et al. 1994). Der Transkriptionsfaktor liegt im Zytosol an ein inhibitorisches Protein, I $\kappa$ B, gebunden vor. Aktivierende Stimuli bewirken eine Phosphorylierung von I $\kappa$ B durch die I $\kappa$ B Kinase (IKK); daraufhin wird es ubiquitiniert und anschließend über das Proteasom abgebaut (Rothwarf und Karin 1999). Auch an der Synthese des Transkriptionsfaktors ist das Proteasom beteiligt: die p50-Untereinheit von NF $\kappa$ B entsteht durch limitierte Proteolyse des Vorläufer-Proteins p105 (Fan und Maniatis 1991).

### 4.3.3 Zunahme der Aktivität des activating protein 1

Unter dem Begriff activating protein 1 wird eine Gruppe von dimeren Transkriptionsfaktoren zusammengefasst, die in der Regulation von Prozessen wie Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und Zellstress eine bedeutende Rolle spielen (Piechaczyk und Blanchard 1994). Sie bestehen aus Mitgliedern der Gruppe der bZIP-Proteine (basic region leucine zipper), zu deren wichtigsten Subfamilien jun, fos, ATF und maf gehören (Angel und Karin 1991). In Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Dimere, aktivieren sie verschiedene Promotorregionen ihrer Zielgene (Karin et al. 1997).

Ihre Regulation erfolgt über verschiedene Mechanismen. Zum einen wird die Aktivität der einzelnen Faktoren über Phosphorylierung durch MAPK gesteuert (Karin 1995). So wird die Fähigkeit von c-jun, die Expression seiner Zielgene zu steigern, durch c-jun N terminal kinases erheblich verstärkt (Hibi et al. 1993, Smeal et al. 1994, Dérjard et al. 1994).

Darüber hinaus wird die Transkription der Faktoren durch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli über verschiedene Signaltransduktionskaskaden beeinflusst. So wird beispielsweise die Expression von c-fos durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und UV-Bestrahlung über die Januskinase, die extracellular regulated protein kinase, die c-jun N terminal kinase und die Proteinkinase A verstärkt (Karin 1995). Ferner sind AP1-Faktoren in der Lage, ihre eigene Transkription zu verstärken: Heterodimere aus ATF2 und c-jun steigern die Expression von c-jun (van Dam et al. 1993).

Ein weiterer Regulationsmechanismus beruht auf der Beeinflussung der Stabilität der Proteine (Treier et al. 1994, Tsurumi et al. 1995). Als Beispiel sei c-jun, das ebenso wie die Mehrheit der bZIP-Proteine über das Proteasom abgebaut wird (Acquaviva et al. 2001), genannt: wird c-jun durch JNKs phosphoryliert, kommt es zur Abnahme der Ubiquitinierung des Proteins und folglich zur Verringerung des Abbaus durch des Proteasom (Musti et al. 1997).

Die Tatsache, dass die Mehrheit der AP1-Faktoren über das Proteasom abgebaut wird, liefert eine mögliche Erklärung für die im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe eines AP1-Reportergenkonstrukts gewonnen Daten. Dabei zeigte sich, dass sich die Aktivität von AP1 sowohl durch Inkubation mit Serum als auch durch Behandlung mit Isoproterenol um Faktor 3 steigern lässt. Diese Aktivitätszunahme konnte durch Koinkubation mit Proteasominhibitoren verstärkt werden, so dass Behandlung mit Serum und 1  $\mu$ M MG132 in einer zehnfachen Erhöhung der Aktivität von AP1 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen resultierte. Interessanterweise führte auch die Behandlung mit MG132 allein zu einer Steigerung der Aktivität von AP1 um Faktor 5. Dies könnte eine Erklärung für die weiter oben beschriebene Tatsache sein, dass ausschließlich mit Proteasominhibitoren behandelte Zellen einen vitaleren Eindruck machen und Wachstum zeigen.

Eine weitere Ursache für die Steigerung der AP1-Aktivität könnte in der Signalkaskade der MAPK liegen: während für ERK 1/2 gezeigt werden konnte, dass ihre Aktivierbarkeit durch Proteasominhibition unterdrückt werden kann, wurden p38 und JNK/ SAPK, von denen die Mehrzahl der AP1-Faktoren aktiviert wird, nicht untersucht. Für eine Rolle der JNK/ SAPK und p38 MAPK spricht, dass sie zum Teil durch rac, einer monomeren GTPase, aktiviert werden. In ihrer bereits weiter oben zitierten Arbeit konnten Lerm et al. zeigen, dass Behandlung mit Proteasominhibitoren nach Stimulation von rac in einer Daueraktivierung von JNK, zu deren wichtigsten Substraten c-jun und ATF2 gehören, durch Stabilisierung von rac resultiert (Lerm et al. 2002).

Dementsprechend könnten sowohl verringerter Abbau von AP1 als auch verstärkte Aktivierung durch rac Ursache der verstärkten AP1-Aktivität sein.

Lässt sich die gesteigerte AP1-Aktivität auch gut durch die oben genannten Me-

chanismen erklären, so spricht sie nicht für die postulierte Suppression der Hypertrophie durch Proteasominhibitoren. Hierzu ist zu diskutieren, dass das Proteasom als der zentrale Abbaumechanismus zellulärer Proteine im Abbau nahezu aller – aktivierenden wie hemmenden – Signalmoleküle eine Rolle spielt. In der Tat scheinen die Fähigkeit, die Transkription von Zielgenen zu aktivieren, und hohe Instabilität durch schnelle Ubiquitinierung und konsekutiven Abbau grundsätzlich eng mit einander verknüpft zu sein (Salghetti et al. 2000, Thomas und Tyers 2000). Folge der Inhibition des Proteasoms ist somit die Veränderung der Aktivität zahlreicher Signalmediatoren auf allen Ebenen ihres komplexen Zusammenspiels. Insofern sind gegensätzliche Effekte keinesfalls überraschend. So führt die oben erwähnte Stabilisierung von rac nicht nur, wie spekuliert, zu einer Aktivierung von c-jun und ATF2 über die MAPK sondern auch zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors MEF2C, für den vor kurzem die Aktivierung der Helicase CHAMP (cardiac helicase activated by MEF2 protein) gezeigt werden konnte (Liu et al. 2001). Für diese Helicase wird ein supprimierender Einfluss auf Hypertrophie über den CDK Inhibitor p21<sup>CIP1</sup>, der ebenfalls über das Proteasom abgebaut wird, diskutiert (Liu und Olson 2002).

### 4.3.4 Abschließende Bemerkungen

Selbst bei Konzentration auf die wichtigsten Signalwege, würde es den Rahmen dieser Arbeit sprengen, den Einfluss des Proteasoms auf einzelne Mediatoren gezielt zu untersuchen. Konnten auch einige wichtige mögliche Mechanismen identifiziert werden – verminderte rRNA-Synthese, reduzierte Aktivität der ERK 1/2, Abnahme der NFκB-Aktivität –, so erscheint es insgesamt doch schwierig, einen Hauptmechanismus der Suppression der Hypertrophie zu bestimmen. Doch die Daten der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass es bei allen gegenläufigen, teils pro- teils antihypertrophen Substraten der Proteasominhibitoren unter dem Strich einen spezifischen, antihypertrophen Effekt gibt und dass dieser augenscheinlich bei niedrigen Konzentrationen einen geringen bis gar keinen zytotoxischen Effekt auf die Zellen ausübt.

## **5 Zusammenfassung**

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass sich die Hypertrophie kardialer Myozyten durch Inhibition des Proteasoms supprimieren lässt.

Dazu wurden neonatale Rattenkardiomyozyten in Kultur mit Hypertrophie-induzierenden Stimuli und Proteasominhibitoren behandelt und zunächst auf Merkmale der Hypertrophie hin untersucht. Dabei zeigte sich eine dosisabhängige Verringerung des durch die hypertrophen Agonisten ausgelösten Zellwachstums bei gleichzeitiger Inkubation mit Proteasominhibitoren. Weiterhin konnte eine Abnahme von Hypertrophiemarkern sowohl auf Proteinebene ( $\beta$ -myosin heavy chain,  $\alpha$ -sarcomeric actin und  $\alpha$ -smooth muscle actin) als auch auf Genexpressionsebene (BNP) gemessen werden. Darüber hinaus wurde eine verringerte Gesamt-RNA- und Proteinsynthese ermittelt.

In Kontrollversuchen konnte die effiziente und dosisabhängige Inhibition des Proteasoms unter den eingesetzten Proteasominhibitorkonzentrationen gezeigt werden. So konnte mit Hilfe von Western Blots eine Akkumulation polyubiquitiner Proteine nachgewiesen werden. Die dosisabhängige Abnahme der Aktivität des Proteasoms wurde über den Abbau fluorogener Substrate gezeigt. Des Weiteren wurde durch Messung der Fluoreszenz nach Expression eines mit Ubiquitin modifizierten GFP-Konstrukts (Ub<sup>G76V</sup>-GFP) die dosis- und inkubationszeitabhängige Hemmung des 26S Proteasoms belegt.

Als mögliche Mechanismen für den antihypertrophen Effekt der Proteasominhibitoren konnten in weiteren Versuchen eine verminderte Aktivierbarkeit der MAP Kinasen ERK 1/2, eine reduzierte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B sowie eine Abnahme der rRNA-Synthese identifiziert werden. Dem gegenüber steht eine verstärkte Aktivität des Transkriptionsfaktors AP1. Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass die Interaktion der Proteasominhibitoren mit Signaltransduktionskaskaden eine mögliche Ursache für ihre antihypertrophe Wirkung darstellt.

**6 Anhang****A Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:	Die wichtigsten Signaltransduktionswege in der Hypertrophie	6
Abbildung 2:	Die Kaskade der mitogen activated protein kinases (MAPK)	8
Abbildung 3:	Das Ubiquitin-Proteasom-System	9
Abbildung 4:	Strukturformeln der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Proteasominhibitoren	14
Abbildung 5:	Mit FITC-konjugiertem Phalloidin gefärbte NRC (a) und mit Scion Image bestimmte Zellfläche (b)	31
Abbildung 6:	Mit 10% FCS und verschiedenen Inhibitoren über 48 Stunden behandelte und mit Phalloidin-FITC gefärbte NRC	42
Abbildung 7:	Veränderung der Zellfläche nach Behandlung mit 10% FCS allein und kombiniert mit ALLM, MG132 oder MG262	43
Abbildung 8:	Mit 10 µM Isoproterenol und 0,05-1 µM MG132 über 48 Stunden behandelte und mit Phalloidin-FITC gefärbte NRC	44
Abbildung 9:	Veränderung der Zellfläche nach Behandlung mit 10 µM Isoproterenol allein und kombiniert mit 0,05-1 µM MG132	45
Abbildung 10:	Mit 20 µM Angiotensin II und 0,05-1 µM MG132 über 48 Stunden behandelte und mit Phalloidin-TRITC gefärbte NRC	46
Abbildung 11:	Veränderung der Zellfläche nach Behandlung mit 20 µM Angiotensin II allein und kombiniert mit 0,05-1 µM MG132	47
Abbildung 12:	Veränderung der Proteinmenge von $\beta$ MHC nach 48-	85

	stündiger Stimulation mit 10 $\mu$ M Isoproterenol allein und kombiniert mit 0,05-1 $\mu$ M MG132	48
Abbildung 13:	Veränderung der Proteinmenge von $\alpha$ -sarcomeric actin nach 48-stündiger Stimulation mit 10 $\mu$ M Isoproterenol allein und kombiniert mit 0,05-1 $\mu$ M MG132	49
Abbildung 14:	Veränderung der Proteinmenge von $\alpha$ -smooth muscle actin nach 48-stündiger Stimulation mit 10 $\mu$ M Isoproterenol allein und kombiniert mit 0,05-1 $\mu$ M MG132	50
Abbildung 15:	Expression von BNP nach 24-stündiger Behandlung mit 50 $\mu$ M Isoproterenol allein und kombiniert mit 1 $\mu$ M MG132	51
Abbildung 16:	Veränderung der Proteinsynthese nach 24-stündiger Inkubation mit 10% FCS und ALLM, MG132 bzw. MG262	52
Abbildung 17:	Veränderung der Proteinsynthese nach 24-stündiger Inkubation mit 10% FCS (a) bzw. 100 $\mu$ M Isoproterenol (b) und 0,05-1 $\mu$ M MG132	53
Abbildung 18:	Veränderung der RNA-Synthese nach 24-stündiger Inkubation mit 10% FCS und ALLM, MG132 bzw. MG262	54
Abbildung 19:	Veränderung der RNA-Synthese nach 24-stündiger Inkubation mit 10% FCS (a) bzw. 100 $\mu$ M Isoproterenol (b) und 0,05-1 $\mu$ M MG132	55
Abbildung 20:	Veränderung der ribosomalen RNA-Synthese nach 24-stündiger Inkubation mit 10% FCS, 1 $\mu$ M MG132 und 2,5 $\mu$ g/ ml $\alpha$ -Amanitin	57
Abbildung 21:	Akkumulation polyubiquitinerter Proteine nach Inkubation mit 10 $\mu$ M Isoproterenol allein und kombiniert mit 0,05-1 $\mu$ M MG132 über 12 (a), 24 (b), 48 (c) und 72 Stunden (d)	58
Abbildung 22:	Aktivität des Proteasoms nach 48-stündiger Inkubation mit	86

	10 µM Isoproterenol und 0,05-1 µM MG132	60
Abbildung 23:	Fluoreszierende Zellen/ Sichtfeld nach Transfektion mit Ub <sup>G76V</sup> -GFP und 24- bzw. 48-stündiger Stimulation mit 10 µM Isoproterenol und 0,05-1 µM MG132	61
Abbildung 24:	Veränderung des Anteils der aktiven Form von ERK 1/2 nach 4-stündiger Inkubation mit MG132 und 10-minütiger Stimulation mit 10% FCS	62
Abbildung 25:	Veränderung des Anteils der aktiven Form von ERK 1/2 nach 4-stündiger Inkubation mit MG132 und 10-minütiger Stimulation mit 100 µM Phenylephrin	63
Abbildung 26:	Veränderung des Anteils der aktiven Form von ERK 1/2 nach 4-stündiger Inkubation mit MG132 und 20-minütiger Stimulation mit 50 µM Isoproterenol	64
Abbildung 27:	Veränderung des Anteils der aktiven Form von ERK 1/2 nach 4-stündiger Inkubation mit MG262 und 20-minütiger Stimulation mit 50 µM Isoproterenol	65
Abbildung 28:	Veränderung des Anteils der aktiven Form von ERK 1/2 nach 4-stündiger Inkubation mit ALLM und 20-minütiger Stimulation mit 50 µM Isoproterenol	65
Abbildung 29:	Veränderung der Aktivität von NFκB nach 24-stündiger Inkubation mit 50 µM Isoproterenol allein und kombiniert mit MG132 oder MG262	66
Abbildung 30:	Veränderung der Aktivität von AP1 nach 24-stündiger Inkubation mit 10% FCS allein und kombiniert mit MG132 oder MG262	67
Abbildung 31:	Veränderung der Aktivität von AP1 nach 24-stündiger Inkubation mit 50 µM Isoproterenol allein und kombiniert mit MG132 oder MG262	68



Abbildung 32:	Veränderung der Aktivität von AP1 nach 24-stündiger Inkubation mit MG132 oder MG262	69
Abbildung 33:	Mit Ub <sup>G76V</sup> -GFP transfizierte NRC nach 48-stündiger Behandlung mit 10 µM Isoproterenol allein (a) und kombiniert mit 1 µM MG132 (b)	78
Abbildung 34:	Phosphatasen des MAPK-Signalwegs	79

**B Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Relativer Anteil der einzelnen Proteasomunterformen und der endogenen Aktivatoren PA28 und PA700 im Zytosol von HeLa-Zellen (Tanahashi et al. 2000).	10
Tabelle 2: Physiologische Funktionen und wichtige Substrate des Proteasoms (modifiziert nach Kisselev und Goldberg 2001).	13
Tabelle 3: Erstantikörper	26
Tabelle 4: Zweitantikörper	26
Tabelle 5: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele	27
Tabelle 6: Effizienz der getesteten Transfektionsreagenzien	34

**C     Abkürzungsverzeichnis**

$\alpha$ SA	$\alpha$ -sarcomeric actin
$\alpha$ SMA	$\alpha$ -smooth muscle actin
AC	Adenylatzyklase
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
AP1	activating protein 1
APS	Ammoniumperoxydisulfat
Ara-C	Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid
AT II	Angiotensin II
ATF2	activating transcription factor 2
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$ MHC	$\beta$ -myosin heavy chain
BNP	B-type oder brain natriuretic peptide
BSA	bovines Serumalbumin
bZIP	basic region leucine zipper
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cdc42	Homologon zum Zellteilungszyklusgen 42 der Hefe
CDK	cyclin dependent kinase
CHAMP	cardiac helicase activated by MEF2 protein
CR	Zytokin-Rezeptor
DAG	Diacylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E1	Ubiquitin aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin carrier protein
E3	Ubiquitin Protein Ligase
ECL	Enhanced Chemiluminescence Lösung
egr-1	early growth response protein 1
elk1	Ets-like transcription factor 1
ERK 1/2	Extracellular signal regulated protein kinases 1/2 (auch: extracellularly responsive kinase, MAPK p44/42)

ET-1	Endothelin 1
FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
g	Erdbeschleunigung ( $9,81 \text{ ms}^{-2}$ )
GFP	green fluorescent protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G <sub>s</sub> , G <sub>i</sub> , G <sub>q</sub>	GTP bindende Proteine
hsp70	Hitzeschockprotein 70
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IKK	I $\kappa$ B Kinase
IL-1	Interleukin 1
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 beta
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
JAK	Januskinase
JNK	c-jun N terminal Kinase (auch: SAPK)
L-15	Leibovitz-15 Medium
LMP	low molecular weight protein
M199	Medium 199
MAPK	mitogen activated protein kinase
MAPKAPK	MAPK activated protein kinase
MAPKK	MAPK Kinase
MAPKKK	MAPKK Kinase
MCA	Methylcoumarylamid
MECL	multicatalytic endopeptidase complex subunit
MEF2	myocyte enhancer factor 2
MEK	mitogen activated ERK activating kinase, eine MAPKK
MEKK	MEK Kinase
MHC I	major histocompatibility complex I
MKK	eine MAPKK
MKP	MAPK Phosphatase

mRNA	messenger RNA
NBCS	Serum neugeborener Kälber
NF $\kappa$ B	nuclear transcription factor kappa B
NRC	neonatale Rattenkardiomyozyten
NS	nukleäre Substrate
NTF	nukleäre Transkriptionsfaktoren
PA28	Proteasomaktivator 28
PA700	Proteasomaktivator 700
PAC	phosphatase of activated cells
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phenylephrin
PFA	Paraformaldehyd
PI31	Proteasominhibitor 31
PIP <sub>2</sub>	Posphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC $\beta$	Phospholipase C $\beta$
PP2A	protein phosphatase 2A
PTP	protein tyrosin phosphatase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rac	Ras related C <sub>3</sub> -botulinum toxin substrate, ein Mitglied der Ras-Familie
Raf	eine MAPKKK
Ras	rat sarcoma virus, eine p21 GTPase
rho	ras homologous, eine p21 GTPase
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RSTK	Rezeptor mit Threonin/ Serin-Kinase Aktivität
RTK	Rezeptor mit Tyrosin-Kinase Aktivität
SAP1a	SRF accessory protein 1 oder stress-activated protein 1
SAPK	stress-activated protein kinase (auch: JNK)

SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodezylsulfat
SEK	SAPK Kinase
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
Smad	Wirbeltierhomologon des Mothers against dpp-Proteins der Drosophila
STAT	signal transducer and activator of transcription
Suc-LLVY-MCA	Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-4-Methyl-7-Coumarylamid
SV40	simian virus 40
T <sub>3</sub>	Trijodthyronin
TBP	T <sub>3</sub> -bindendes Protein
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TCF	ternary complex factors
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGFβ	transforming growth factor beta
TNFα	tumor necrosis factor alpha
TR	T <sub>3</sub> -Rezeptor
tRNA	transfer RNA
Ub	Ubiquitin
UBF	upstream binding factor

**D     Literaturverzeichnis**

1. Acquaviva C, Ferrara P, Bossis G, Brockly F, Salvat C, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M: Degradation of cellular and viral Fos proteins. *Biochimie*. 2001, 83 (3-4), S. 357-62.
2. Adams JW, Migita DS, Yu MK, Young R, Hellickson MS, Castro-Vargas FE, Domingo JD, Lee PH, Bui JS, Henderson SA: Prostaglandin F2 alpha stimulates hypertrophic growth of cultured neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem*. 1996, 271 (2), S. 1179-86.
3. Akopian TN, Kisselev AF, Goldberg AL: Processive degradation of proteins and other catalytic properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. *J Biol Chem*. 1997, 272 (3), S. 1791-8.
4. Angel P, Karin M: The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*. 1991, 1072 (2-3), S. 129-57.
5. Baumeister W, Dahlmann B, Hegerl R, Kopp F, Kuehn L, Pfeifer G: Electron microscopy and image analysis of the multicatalytic proteinase. *FEBS Lett*. 1988, 241 (1-2), S. 239-45.
6. Brown MG, Driscoll J, Monaco JJ: MHC-linked low-molecular mass polypeptide subunits define distinct subsets of proteasomes. Implications for divergent function among distinct proteasome subsets. *J Immunol*. 1993, 151 (3), S. 1193-204.
7. Bush KT, Goldberg AL, Nigam SK: Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *J Biol Chem*. 1997, 272 (14), S. 9086-92.
8. Calderone A, Takahashi N, Izzo NJ Jr, Thaik CM, Colucci WS: Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation*. 1995, 92 (9), S. 2385-90.
9. Chu-Ping M, Slaughter CA, DeMartino GN: Purification and characterization of a protein inhibitor of the 20S proteasome (macropain). *Biochim Biophys Acta*.

- 1992, 1119 (3), S. 303-11.
10. Chu-Ping M, Vu JH, Proske RJ, Slaughter CA, DeMartino GN: Identification, purification, and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20 S proteasome. *J Biol Chem.* 1994, 269 (5), S. 3539-47.
  11. Clark WA, Decker ML, Behnke-Barclay M, Janes DM, Decker RS: Cell contact as an independent factor modulating cardiac myocyte hypertrophy and survival in long-term primary culture. *Mol Cell Cardiol.* 1998, 30 (1), S. 139-55.
  12. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL: Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem.* 1996, 65, S. 801-47.
  13. Denhardt DT: Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem J.* 1996, 318 (Pt 3), S. 729-47.
  14. Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ: JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell.* 1994, 76 (6), S. 1025-37.
  15. Deveraux Q, Ustrell V, Pickart C, Rechsteiner M: A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem.* 1994, 269 (10), S. 7059-61.
  16. Drexler HC, Risau W, Konerding MA: Inhibition of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells. *FASEB J.* 2000, 14 (1), S. 65-77.
  17. Fan CM, Maniatis T: Generation of p50 subunit of NF-kappa B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature.* 1991, 354 (6352), S. 395-8.
  18. Fedida D, Braun AP, Giles WR: Alpha 1-adrenoceptors in myocardium: functional aspects and transmembrane signaling mechanisms. *Physiol Rev.* 1993, 73 (2), S. 469-87.



19. Fenteany G, Standaert RF, Reichard GA, Corey EJ, Schreiber SL: A beta-lactone related to lactacystin induces neurite outgrowth in a neuroblastoma cell line and inhibits cell cycle progression in an osteosarcoma cell line. *Proc Natl Acad Sci.* 1994, *91* (8), S. 3358-62.
20. Ferrell K, Wilkinson CR, Dubiel W, Gordon C: Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem Sci.* 2000, *25* (2), S. 83-8.
21. Fleming JA, Lightcap ES, Sadis S, Thoroddsen V, Bulawa CE, Blackman RK: Complementary whole-genome technologies reveal the cellular response to proteasome inhibition by PS-341. *Proc Natl Acad Sci.* 2002, *99* (3), S. 1461-6.
22. Früh K, Gossen M, Wang K, Bujard H, Peterson PA, Yang Y: Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. *EMBO J.* 1994, *13* (14), S. 3236-44.
23. Glickman MH, Ciechanover A: The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 2002, *82* (2), S. 373-428.
24. Goldberg AL, Rock KL: Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature.* 1992, *357* (6377), S. 375-9.
25. Guo GG, Gu M, Etlinger JD: 240-kDa proteasome inhibitor (CF-2) is identical to delta-aminolevulinic acid dehydratase. *J Biol Chem.* 1994, *269* (17), S. 12399-402.
26. Hanford DS, Thuerauf DJ, Murray SF, Glembotski CC: Brain natriuretic peptide is induced by alpha 1-adrenergic agonists as a primary response gene in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1994, *269* (42), S. 26227-33.
27. Hannan RD, Luyken J, Rothblum LI: Regulation of rDNA transcription factors during cardiomyocyte hypertrophy induced by adrenergic agents. *J Biol*

- Chem. 1995, 270 (14), S. 8290-7.
28. Hannan RD, Rothblum LI: Regulation of ribosomal DNA transcription during neonatal cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 1995, 30 (4), S. 501-10.
  29. Harris KF, Shoji I, Cooper EM, Kumar S, Oda H, Howley PM: Ubiquitin-mediated degradation of active Src tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci.* 1999, 96 (24), S. 13738-43.
  30. Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM, Schaub MC: Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 1997, 29 (11), S. 2873-92.
  31. Hershko A, Ciechanover A: The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998, 67, S. 425-79.
  32. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M: Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 1993, 7 (11), S. 2135-48.
  33. Hirotani S, Otsu K, Nishida K, Higuchi Y, Morita T, Nakayama H, Yamaguchi O, Mano T, Matsumura Y, Ueno H, Tada M, Hori M: Involvement of nuclear factor-kappaB and apoptosis signal-regulating kinase 1 in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation.* 2002, 105 (4), S. 509-15.
  34. Ichikawa K, Hashizume K: Thyroid hormone action in the cell. *Endocr J.* 1995, 42 (2), S. 131-40.
  35. Ito H, Adachi S, Tamamori M, Fujisaki H, Tanaka M, Lin M, Akimoto H, Marumo F, Hiroe M: Mild hypoxia induces hypertrophy of cultured neonatal rat cardiomyocytes: a possible endogenous endothelin-1-mediated mechanism. *J Mol Cell Cardiol.* 1996, 28 (6), S. 1271-7.
  36. Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Murumo F, Hiroe M: Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 1993, 92 (1), S. 398-403.

37. Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Tsujino M, Adachi S, Shichiri M, Koike A, Nogami A, Marumo F: Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation*. 1993, 87 (5), S. 1715-21.
38. Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V: Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci*. 1988, 85 (2), S. 339-43.
39. Jaken S: Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr Opin Cell Biol*. 1996, 8 (2), S. 168-73.
40. Karin M: The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Biol Chem*. 1995, 270 (28), S. 16483-6.
41. Karin M, Liu Z, Zandi E: AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 1997, 9 (2), S. 240-6.
42. Kim NN, Villarreal FJ, Printz MP, Lee AA, Dillmann WH: Trophic effects of angiotensin II on neonatal rat cardiac myocytes are mediated by cardiac fibroblasts. *Am J Physiol*. 1995, 269 (3 Pt 1), S. E426-37.
43. Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL: The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem*. 1999, 274 (6), S. 3363-71.
44. Kisselev AF, Goldberg AL: Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol*. 2001, 8 (8), S. 739-58.
45. Koepp DM, Harper JW, Elledge SJ: How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*. 1999, 97 (4), S. 431-4.
46. Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D, Rapp UR: Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature*. 1993, 364 (6434), S. 249-52.
47. Komuro I, Katoh Y, Kaida T, Shibazaki Y, Kurabayashi M, Hoh E, Takaku F,

- Yazaki Y: Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation. *J Biol Chem.* 1991, 266 (2), S. 1265-8.
48. Komuro I, Kurabayashi M, Takaku F, Yazaki Y: Expression of cellular oncogenes in the myocardium during the developmental stage and pressure-overloaded hypertrophy of the rat heart. *Circ Res.* 1988, 62 (6), S. 1075-9.
49. Kopp F, Dahlmann B, Hendil KB: Evidence indicating that the human proteasome is a complex dimer. *J Mol Biol.* 1993, 229 (1), S. 14-9.
50. Lavandero S, Foncela R, Perez V, Sapag-Hagar M: Effect of inhibitors of signal transduction on IGF-1-induced protein synthesis associated with hypertrophy in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *FEBS Lett.* 1998, 422 (2), S. 193-6.
51. Lee HR, Henderson SA, Reynolds R, Dunnmon P, Yuan D, Chien KR: Alpha 1-adrenergic stimulation of cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells. Effects on myosin light chain-2 gene expression. *J Biol Chem.* 1988, 263 (15), S. 7352-8.
52. Lerm M, Pop M, Fritz G, Aktories K, Schmidt G: Proteasomal degradation of cytotoxic necrotizing factor 1-activated rac. *Infect Immun.* 2002, 70 (8), S. 4053-8.
53. Liu ZP, Nakagawa O, Nakagawa M, Yanagisawa H, Passier R, Richardson JA, Srivastava D, Olson EN: CHAMP, a novel cardiac-specific helicase regulated by MEF2C. *Dev Biol.* 2001, 234 (2), S. 497-509.
54. Liu ZP, Olson EN: Suppression of proliferation and cardiomyocyte hypertrophy by CHAMP, a cardiac-specific RNA helicase. *Proc Natl Acad Sci.* 2002, 99 (4), S. 2043-8.
55. Long CS, Ordahl CP, Simpson PC: Alpha 1-adrenergic receptor stimulation of sarcomeric actin isogene transcription in hypertrophy of cultured rat heart muscle cells. *J Clin Invest.* 1989, 83 (3), S. 1078-82.

56. Lopes UG, Erhardt P, Yao R, Cooper GM: p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J Biol Chem.* 1997, 272 (20), S. 12893-6.
57. Löwe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R: Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science.* 1995, 268 (5210), S. 533-9.
58. Lu Z, Liu D, Hornia A, Devonish W, Pagano M, Foster DA: Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol.* 1998, 18 (2), S. 839-45.
59. Ma CP, Slaughter CA, DeMartino GN: Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain). *J Biol Chem.* 1992, 267 (15), S. 10515-23.
60. McDermott PJ, Morgan HE: Contraction modulates the capacity for protein synthesis during growth of neonatal heart cells in culture. *Circ Res.* 1989, 64 (3), S. 542-53.
61. Meriin AB, Gabai VL, Yaglom J, Shifrin VI, Sherman MY: Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis. *J Biol Chem.* 1998, 273 (11), S. 6373-9.
62. Messerli JM, Eppenberger-Eberhardt ME, Rutishauser BM, Schwarb P, von Arx P, Koch-Schneidemann S, Eppenberger HM, Perriard JC: Remodelling of cardiomyocyte cytoarchitecture visualized by three-dimensional (3D) confocal microscopy. *Histochemistry.* 1993, 100 (3), S. 193-202.
63. Mitch WE, Goldberg AL: Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med.* 1996, 335 (25), S. 1897-905.
64. Morgan HE, Chua BHL, Russo L: Hrsg.: Fozzard et al.: The Heart. New York. Raven Press. 1992. S. 1505-1524.
65. Murakami K, Etlinger JD: Endogenous inhibitor of nonlysosomal high molecular weight protease and calcium-dependent protease. *Proc Natl Acad Sci.* 1986, 83 (20), S. 7588-92.

66. Musti AM, Treier M, Bohmann D: Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science*. 1997, 275 (5298), S. 400-2.
67. Neer EJ: Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*. 1995, 80 (2), S. 249-57.
68. Ogawa Y, Itoh H, Nakagawa O, Shirakami G, Tamura N, Yoshimasa T, Nagata K, Yoshida N, Nakao K: Characterization of the 5'-flanking region and chromosomal assignment of the human brain natriuretic peptide gene. *J Mol Med*. 1995, 73 (9), S. 457-63.
69. Orlowski M: The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry*. 1990, 29 (45), S. 10289-97.
70. Orlowski M, Cardozo C, Michaud C: Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry*. 1993, 32 (6), S. 1563-72.
71. Orlowski RZ, Small GW, Shi YY: Evidence that inhibition of p44/42 mitogen-activated protein kinase signaling is a factor in proteasome inhibitor-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 2002, 277 (31), S. 27864-71.
72. Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M: Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*. 1995, 269 (5224), S. 631-2.
73. Pahl HL: Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999, 18 (49), S. 6853-66.
74. Palmer JN, Hartogensis WE, Patten M, Fortuin FD, Long CS: Interleukin-1 beta induces cardiac myocyte growth but inhibits cardiac fibroblast proliferation in culture. *J Clin Invest*. 1995, 95 (6), S. 2555-64.
75. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T: The ubiquitin-proteasome

- pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell*. 1994, 78 (5), S. 773-85.
76. Parker TG, Packer SE, Schneider MD: Peptide growth factors can provoke "fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. *J Clin Invest*. 1990, 85 (2), S. 507-14.
77. Piechaczyk M, Blanchard JM: c-fos proto-oncogene regulation and function. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1994, 17 (2), S. 93-131.
78. Pinson A, Schluter KD, Zhou XJ, Schwartz P, Kessler-Icekson G, Piper HM: Alpha- and beta-adrenergic stimulation of protein synthesis in cultured adult ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1993, 25 (4), S. 477-90.
79. Purcell NH, Tang G, Yu C, Mercurio F, DiDonato JA, Lin A: Activation of NF-kappa B is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci*. 2001, 98 (12), S. 6668-73.
80. Read MA, Neish AS, Luscinskas FW, Palombella VJ, Maniatis T, Collins T: The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression. *Immunity*. 1995, 2 (5), S. 493-506.
81. Riede UN, Schaefer HE: Subletale Zellschädigung. Hrsg.: Riede UN, Schaefer HE: Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage. Stuttgart, New York. Thieme. 1999. S. 128ff.
82. Rivett AJ: The multicatalytic proteinase. Multiple proteolytic activities. *J Biol Chem*. 1989, 264 (21), S. 12215-9.
83. Rock KL, Goldberg AL: Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol*. 1999, 17, S. 739-79.
84. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL: Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 1994, 78 (5), S. 767-71.

85. Rothwarf DM, Karin M: The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE*. 1999, 1999 (5), S. RE1.
86. Rupp H, Berger HJ, Pfeifer A, Werdan K: Effect of positive inotropic agents on myosin isozyme population and mechanical activity of cultured rat heart myocytes. *Circ Res*. 1991, 68 (4), S. 1164-73.
87. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S: Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell*. 1993, 75 (5), S. 977-87.
88. Salghetti SE, Muratani M, Wijnen H, Futcher B, Tansey WP: Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci*. 2000, 97 (7), S. 3118-23.
89. Schaub MC, Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM: Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med*. 1997, 75 (11-12), S. 901-20.
90. Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR: Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*. 2000, 404 (6779), S. 709-10.
91. Siehl D, Chua BH, Lautensack-Belser N, Morgan HE: Faster protein and ribosome synthesis in thyroxine-induced hypertrophy of rat heart. *Am J Physiol*. 1985, 248 (3 Pt 1), S. C309-19.
92. Simpson P, Savion S: Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. Cross-striations, ultrastructure, and chronotropic response to isoproterenol. *Circ Res*. 1982, 50 (1), S. 101-16.
93. Simpson PC, Long CS, Waspe LE, Henrich CJ, Ordahl CP: Transcription of early developmental isogenes in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 1989, Suppl 5, S. 79-89.
94. Smeal T, Hibi M, Karin M: Altering the specificity of signal transduction



- cascades: positive regulation of c-Jun transcriptional activity by protein kinase A. *EMBO J.* 1994, 13 (24), S. 6006-10.
95. Stack JH, Whitney M, Rodems SM, Pollok BA: A ubiquitin-based tagging system for controlled modulation of protein stability. *Nat Biotechnol.* 2000, 18 (12), S. 1298-302.
96. Stangl K, Gunther C, Frank T, Lorenz M, Meiners S, Ropke T, Stelter L, Moobed M, Baumann G, Kloetzel PM, Stangl V: Inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway induces differential heat-shock protein response in cardiomyocytes and renders early cardiac protection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002, 291 (3), S. 542-9.
97. Stefanovsky VY, Pelletier G, Hannan R, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI, Moss T: An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell.* 2001, 8 (5), S. 1063-73.
98. Sugden PH, Bogoyevitch MA: Endothelin-1-dependent signaling pathways in the myocardium. *Trends Cardiovasc Med.* 1996, 6, S. 87-94.
99. Sugden PH, Clerk A: Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med.* 1998, 76 (11), S. 725-46.
100. Sugden PH, Fuller SJ: Regulation of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. *Biochem J.* 1991, 273 (1), S. 21-37.
101. Swynghedauw B: Cardiac hypertrophy and failure. London, Paris. John Libbey Eurotext. 1990. S. 1-696.
102. Tanahashi N, Murakami Y, Minami Y, Shimbara N, Hendil KB, Tanaka K.: Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J Biol Chem.* 2000, 275 (19), S. 14336-45.
103. Tanaka K: Molecular biology of proteasomes. *Mol Biol Rep.* 1995, 21 (1), S. 21-6.
104. Tapon N, Hall A: Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of

- the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 1997, 9 (1), S. 86-92.
105. Terzic A, Puceat M, Vassort G, Vogel SM: Cardiac alpha 1-adrenoceptors: an overview. *Pharmacol Rev.* 1993, 45 (2), S. 147-75.
106. Thomas D, Tyers M: Transcriptional regulation: Kamikaze activators. *Curr Biol.* 2000, 10 (9), S. R341-3.
107. Treier M, Staszewski LM, Bohmann D: Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell.* 1994, 78 (5), S. 787-98.
108. Tsubuki S, Saito Y, Kawashima S: Purification and characterization of an endogenous inhibitor specific to the Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading activity in proteasome and its identification as heat-shock protein 90. *FEBS Lett.* 1994, 344 (2-3), S. 229-33.
109. Tsubuki S, Saito Y, Tomioka M, Ito H, Kawashima S: Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J Biochem.* 1996, 119 (3), S. 572-6.
110. Tsurumi C, Ishida N, Tamura T, Kakizuka A, Nishida E, Okumura E, Kishimoto T, Inagaki M, Okazaki K, Sagata N, et al: Degradation of c-Fos by the 26S proteasome is accelerated by c-Jun and multiple protein kinases. *Mol Cell Biol.* 1995, 15 (10), S. 5682-7.
111. van Bilsen M: Signal transduction revisited: recent developments in angiotensin II signaling in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 1997, 36 (3), S. 310-22.
112. van Bilsen M, Chien KR: Growth and hypertrophy of the heart: towards an understanding of cardiac specific and inducible gene expression. *Cardiovasc Res.* 1993, 27 (7), S. 1140-9.
113. van Dam H, Duyndam M, Rottier R, Bosch A, de Vries-Smits L, Herrlich P, Zantema A, Angel P, van der Eb AJ: Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J.* 1993, 12 (2), S. 479-87.

114. van Nocker S, Deveraux Q, Rechsteiner M, Vierstra RD: Arabidopsis MBP1 gene encodes a conserved ubiquitin recognition component of the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci.* 1996, 93 (2), S. 856-60.
115. Vinitsky A, Michaud C, Powers JC, Orlowski M: Inhibition of the chymotrypsin-like activity of the pituitary multicatalytic proteinase complex. *Biochemistry.* 1992, 31 (39), S. 9421-8.
116. Voges D, Zwickl P, Baumeister W: The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem.* 1999, 68, S. 1015-68.
117. Wollert KC, Taga T, Saito M, Narazaki M, Kishimoto T, Glembotski CC, Vernallis AB, Heath JK, Pennica D, Wood WI, Chien KR: Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy. Assembly of sarcomeric units in series VIA gp130/leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways. *J Biol Chem.* 1996, 271 (16), S. 9535-45.
118. Xu Y, Hopfner RL, McNeill JR, Gopalakrishnan V: Vasopressin accelerates protein synthesis in neonatal rat cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem.* 1999, 195 (1-2), S. 183-90.
119. Yamamoto K, Burnett JC Jr, Jougasaki M, Nishimura RA, Bailey KR, Saito Y, Nakao K, Redfield MM: Superiority of brain natriuretic peptide as a hormonal marker of ventricular systolic and diastolic dysfunction and ventricular hypertrophy. *Hypertension.* 1996, 28 (6), S. 988-94.
120. Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R, Takano H, Yazaki Y: Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* 1996, 271 (6), S. 3221-8.
121. Yamazaki T, Komuro I, Zou Y, Kudoh S, Mizuno T, Hiroi Y, Shiojima I, Takano H, Kinugawa K, Kohmoto O, Takahashi T, Yazaki Y: Protein kinase A and protein kinase C synergistically activate the Raf-1 kinase/mitogen-activated protein kinase cascade in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1997, 29 (9), S. 2491-501.

122. Yue TL, Gu JL, Wang C, Reith AD, Lee JC, Mirabile RC, Kreutz R, Wang Y, Maleeff B, Parsons AA, Ohlstein EH: Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* 2000, 275 (48), S. 37895-901.
123. Zimmermann J, Erdmann D, Lalande I, Grossenbacher R, Noorani M, Furst P: Proteasome inhibitor induced gene expression profiles reveal overexpression of transcriptional regulators ATF3, GADD153 and MAD1. *Oncogene.* 2000, 19 (25), S. 2913-20.
124. Zwickl P, Grziwa A, Puhler G, Dahlmann B, Lottspeich F, Baumeister W: Primary structure of the Thermoplasma proteasome and its implications for the structure, function, and evolution of the multicatalytic proteinase. *Biochemistry.* 1992, 31 (4), S. 964-72.
125. Zwickl P, Kleinz J, Baumeister W: Critical elements in proteasome assembly. *Nat Struct Biol.* 1994, 1 (11), S. 765-70.

## **E Danksagung**

Für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit und die umfassende Betreuung möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Karl Stangl bedanken.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. Gert Baumann und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Peter-M. Kloetzel für ihre Unterstützung und die Möglichkeit der Forschung im molekularbiologischen Labor der Medizinischen Klinik m. S. Kardiologie, Pulmologie und Angiologie der Charité.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Silke Meiners, deren herausragende Betreuung ich stets als außergewöhnliches Privileg empfand.

Darüber hinaus danke ich Andrea Weller, Friederike Steinle und Michael Greinwald sowie den übrigen Mitarbeitern des Kardiologischen Forschungslabors, die mir alle stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Last but not least möchte ich meiner Familie, meinen Freunden und natürlich meiner Freundin Anne für ihre fortwährende Unterstützung danken.

**F      Lebenslauf****Persönliches**

Name	Henryk Dreger
Geburtsdatum, -ort	27. Januar 1978, Berlin
Familienstand	ledig

**Werdegang**

1984 – 1991	14. POS Berlin
1991 – 1997	Einstein-Oberschule (Gymnasium) Berlin, Abitur
08/1997 – 03/1998	Pflegehelfer, GSD Krankenhaus Eichborndamm, Berlin
seit 04/1998	Studium der Humanmedizin, Charité, Humboldt-Universität zu Berlin
03-04/ 1999	Krankenpflegepraktikum, Unfallkrankenhaus Berlin
03/2000	Physikum
08/2000	Famulatur, Kardiologie, KH Friedrichshain Berlin
03/2001	1. Staatsexamen
07/2001	Beginn des experimentellen Teils der Promotion Kardiologisches Forschungslabor, Charité Berlin
03/2002	Famulatur, Kardiologie, Charité Berlin
08/2002	Famulatur, Radiologische Praxis Berlin

**G Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die hier vorliegende Arbeit von mir selbst ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die verwendeten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 15.11.2002